



Université du Québec
à Chicoutimi

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR
LION QUENTIN
B. Sc. CHIMIE

**Identification et quantification de composés biologiquement
actifs des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L.**

AOÛT 2019

*« La grandeur des actions humaines se mesure à l'inspiration qui les
fait naître. »*

LOUIS PASTEUR (1822-1895)

RÉSUMÉ

L'Aralia nudicaulis L. (Araliaceae) a été utilisée à de nombreuses reprises par les tribus amérindiennes pour diverses propriétés telles que : anticancéreuses, anti-inflammatoire, protection hépatique, anti-mycobactériennes et « adaptogènes ». Cependant, très peu d'études cherchent à valoriser cette espèce. Ce projet visait à étudier la composition chimique et de mieux caractériser l'activité biologique de différents extraits de rhizomes d'*Aralia nudicaulis*.

Tout d'abord, des méthodes d'extraction et de fractionnement ont été mises en place afin d'obtenir divers extraits dont les activités biologiques furent évaluées. L'extrait méthanolique fut le point de départ d'un fractionnement complexe visant à obtenir deux fractions respectivement enrichies en composés phénoliques et en saponines triterpéniques.

Dans un premier temps, l'étude de la fraction enrichie en composés phénoliques s'est concentrée sur l'identification et la quantification des composés majoritaires. Une analyse quantitative a donc été effectuée sur les composés majoritaires à l'aide d'une méthode LC-MS mise au point, optimisée et validée. Cette méthode analytique a ensuite été appliquée lors d'un suivi dynamique des composés d'intérêts, permettant de proposer un modèle de standardisation des extraits de rhizomes d'*Aralia nudicaulis*, basé sur la quantification de l'acide chlorogénique. L'extrait enrichi en composés phénoliques a été évalué pour l'inhibition de la production de ROS induite par les UVB et les IRA sur fibroblastes de peau humaine. À 50 µg/mL, cet extrait diminue la production de « Reactive Oxygen Species » (ROS) de 80% et de 70% respectivement pour des fibroblastes exposés aux UltraViolet B (UVB) et InfraRouge A (IRA). Les résultats obtenus avec l'extrait enrichi en composés phénoliques, suggèrent une potentielle application dans le domaine cosmétique.

L'extrait méthanolique a également permis l'obtention d'une fraction enrichie en saponines triterpéniques de type oléanane. Au sein de cette fraction, certains glycosides de ces saponines triterpéniques ont pu être isolés et partiellement identifiés.

REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu, remercier mon directeur et codirecteur, le Pr André PICHETTE et le Pr Jean LEGAULT pour la confiance qu'ils m'ont accordée lors de la réalisation de ce projet. Je tiens à souligner que sans leur travail de financement et de développement, le laboratoire LASEVE ne serait pas une unité de recherche si agréable et experte dans le domaine de la chimie des produits naturels. Grâce à ces deux professeurs, mon intégration au sein du programme de Baccalauréat en Chimie des Produits Naturels et de la Maîtrise en Ressources Renouvelables en tant qu'étudiant international s'est fait dans les meilleures conditions.

Je souhaite tout particulièrement remercier le Pr Vakhtang MSHVILDADZE, sans qui je ne me serais autant épanoui tout au long de mon projet de recherche. Je souhaite mettre en avant les précieux conseils que Vakhtang m'a apporté tout au long de mon processus de recherche tout en me laissant une certaine liberté et responsabilité dans mes choix d'axes de recherche. Il m'a également beaucoup appris par ses connaissances sur l'histoire ainsi que bien évidemment sur le vin. Que ce soit en classe, au laboratoire ou encore lors de séances de pêches, j'ai pu tisser d'excellentes relations que j'espère conserver dans le futur avec le Pr MSHVILDADZE.

Je remercie le Pr Michel FREDERICH pour m'avoir permis d'effectuer un stage au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège et avec qui je souhaiterais grandement poursuivre mon cursus académique par le biais d'un doctorat.

Je souhaite remercier également chaleureusement le Dr François SIMARD et Dr Balla SYLLA pour leurs précieux conseils techniques, leur accompagnement au quotidien au sein du laboratoire LASEVE, mais également pour la bonne ambiance lors de nos matchs de badminton hebdomadaires.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe s'occupant des tests biologiques m'ayant permis d'axer mes recherches tout au long de mon projet. Je souhaite remercier plus particulièrement le Dr Mouadh MIHOUB, grâce à qui il a été possible de donner un aspect cosmétique à notre projet et grâce à qui nous avons pu donner plus d'importance aux résultats publiés.

Un remerciement très spécial au Dr Jérôme ALSARRAF, qui par son immense connaissance, m'a beaucoup appris à propos de divers sujets scientifiques. Il a également su m'écouter et me conseiller dans de nombreux moments de doutes que ce soit dans ma vie professionnelle, personnelle ou même face à des problèmes d'escalade.

Un immense merci à mon acolyte Clément VIRETTO, sans qui ces 5 années universitaires n'auraient pas été si belles et pleines de bons souvenirs. Rien ne changera jamais, même si les voyages nous sépareront.

Je souhaite dire merci à Anne-Elizabeth HARVEY avec qui je partage ma vie et qui a su me supporter et me rassurer dans les moments de doutes du quotidien ainsi que lors de mes périodes de rédaction.

Bien évidemment je ne remercierai jamais assez ma famille que j'aime énormément et sans qui je ne serais pas là, tout particulièrement mes parents et mes 2 petites sœurs qui m'ont apporté tout le soutien mais surtout l'amour nécessaire malgré mon choix de m'expatrier durant ces 3 années.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières

RÉSUMÉ	2
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	4
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ANNEXES	8
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	9
1.1 Introduction.....	10
1.1.1 Objectif général et objectifs spécifiques	12
1.1.2 Division du mémoire.....	12
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	14
2.1 Des Araliaceae à l'Aralia nudicaulis L.....	15
2.1.1 Les ARALIACEAE	15
2.1.2 Le genre <i>Aralia</i>	17
2.1.3 L'Aralia nudicaulis L.	22
2.2 Molécules d'intérêts et activités biologiques associées	24
2.2.1 Les composés phénoliques	24
2.2.2 Les composés phénoliques dans le genre <i>Aralia</i>	26
2.2.3 L'activité antioxydante des composés phénoliques	28
2.2.4 L'activité pro-oxydante liée aux irradiations UVB et IR	30
CHAPITRE 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	32
<i>Aralia nudicaulis</i> L. extract protects Human Skin Fibroblasts against ROS induced by UVB and IRA radiations.	33
Abstract:	33
3.1 Introduction.....	33
3.2 Results and discussion	36
3.2.1 Extraction yield and purification method	36
3.2.2 Identification and optimization of LC-MS conditions	36
3.2.3 Quantitative method validation	37
3.2.4 Quantitative analysis	39
3.2.5 Biological activities screening	40
3.2.6 Evaluation of EFPC protection against UVB and IRA radiations.....	43
3.3 Materials and Methods.....	45
3.3.1 Crude extract and Enriched fraction in phenolic compounds:	45
3.3.2 Standardized extract and standards preparation:	46
3.3.3 Chromatographic instrumentation and conditions:	46
3.3.4 HPLC method validation:	47
3.3.5 Measurement of different biological activities.....	47
3.4 Conclusion	49
References	50

CHAPITRE 4 RÉSUMÉ DÉTAILLÉ DES TRAVAUX COMPLÉMENTAIRES	54
4.0 Préambule	55
SOUS-CHAPITRE 4.1 ÉCHANTILLONAGE ET CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE	
PRÉLIMINAIRE	56
4.1.1 Échantillonnage	56
4.1.2 Extraction et fractionnement	57
4.1.2.1 Extraction solide/liquide par chauffage à reflux	57
4.1.2.2 Extraction liquide/liquide	57
4.1.2.3 Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	59
4.1.3 Bioguidage de l'étude phytochimique	60
4.1.3.1 Activité cytotoxique sur des lignées saines et cancéreuses	60
4.1.3.2 Activités antioxydantes cellulaire et chimique	61
4.1.3.3 Activité anti-inflammatoire sur des macrophages de souris	62
SOUS-CHAPITRE 4.2 ÉTUDES DES FRACTIONS ENRICHIES EN SAPONINES TRITERPÉNIQUES	
.....	65
4.2.1 Fractionnement de l'extrait BuOH.....	65
4.2.1.1 Chromatographie liquide sur résine diaion HP-20	65
4.2.1.2 Chromatographie liquide sur gel de silice	65
4.2.1.3 Chromatographie liquide préparative RP-HPLC-DAD/UV.....	67
4.2.1.4 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	69
SOUS-CHAPITRE 4.3 ÉTUDES DES FRACTIONS ENRICHIES EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ...	74
4.3.1 Fractionnement de l'extrait AcOEt	74
4.3.1.1 Fractionnement sur résine diaion HP-20.....	74
4.3.1.2 HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)	76
4.3.1.3 Tests cosmétiques	77
CONCLUSION	82
Références	85
ANNEXE I CHROMATOGRAMMES	96
ANNEXE II COURBES DE CALIBRATION HPLC.....	100
ANNEXE III ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS BRUTS	102

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 - STRUCTURES DES GINSENOSIDES MAJORITAIRES ISOLES DU PANAX GINSENG C.A.MEY.	16
FIGURE 2 - AIRE DE REPARTITION DE L'ARALIA NUDICAULIS (BLEU) ET DE L'ARALIA HISPIDA (VERT) AU CANADA	18
FIGURE 3 - ARALIA NUDICAULIS L. - LOUIS-MARIE HERBARIUM, UNIVERSITE DE LAVAL (QUEBEC, CANADA)	22
FIGURE 4 - STRUCTURES DES POLYACETYLENES (3R)-FALCARINOL (1) ET (3R,9R,10S)-PANAXYDOL (2) ISOLES DE L'ARALIA NUDICAULIS L.	23
FIGURE 5 - COMPLEXITE ET POIDS MOLECULAIRES DES CLASSES DE COMPOSES PHENOLIQUES LES PLUS COMMUNS DANS LES VEGETAUX.....	24
FIGURE 6 - COMPOSES PHENOLIQUES IDENTIFIES DANS LE GENRE ARALIA.....	27
FIGURE 7 - MECANISME ANTIOXYDANT DES COMPOSES PHENOLIQUES	29
FIGURE 8 - VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LES IRRADIATIONS SOLAIRES SUR LA PEAU.....	31
FIGURE 9 - (A) HPLC PROFILES OF PROTOCATECHUIC ACID (PA), CHLOROGENIC ACID (CHA) AND CAFFEIC ACID (CA) STANDARDS MIX (B) HPLC PROFILE OF EFPC.	37
FIGURE 10 - PATTERN OF THREE PHENOLIC ACIDS (PA, CHA AND CA) DURING THE GROWING SEASON FOR A. NUDICAULIS.	40
FIGURE 11 - EVALUATION OF PROTECTIVE EFFECT OF EFPC AND POSITIVE CONTROLS (A) FOLLOWING UVB AND IRA IRRADIATION (4700 MJ/CM ²) OF HUMAN SKIN FIBROBLAST (WS1). INHIBITION OF DHR-123 FLUORESCENCE (B) OF CELLS TREATED OR NOT WITH EFPC, PROTOCATECHUIC ACID, CHLOROGENIC ACID AND CAFFEIC ACID WAS DETERMINED BY IMAGE J SOFTWARE. THIS ANALYSIS IS REPRESENTATIVE OF THREE INDEPENDENT EXPERIMENTS. SCALE BARS : 200 μ M.....	44
FIGURE 12 - SCHEMA ET RENDEMENTS D'EXTRACTIONS ET DE FRACTIONNEMENT DES RHIZOMES D'ARALIA NUDICAULIS L.	58
FIGURE 13 - CCM RECAPITULATIVE D'EXTRACTIONS SUCCESSIVES DES RHIZOMES D'ARALIA NUDICAULIS L. – CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (26:14:3) – H ₂ SO ₄ (GAUCHE) ET NP-PEG A 365NM (DROITE)	59
FIGURE 14 – (A) PURIFICATION DE L'EXTRAIT BUOH SUR RESINE DIAION HP-20 (B) PURIFICATION DES FRACTIONS F A J SUR GEL DE SILICE (C) PURIFICATION DE LA FRACTION 9 SUR HPLC PREPARATIVE (C) - CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (26:14:3) – H ₂ SO ₄	66
FIGURE 15 - ORGANIGRAMME DE FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION BUOH.....	68
FIGURE 16 - STRUCTURES HYPOTHETIQUES ELUCIDEES A PARTIR DE L'EXTRAIT BUOH DES RHIZOMES D'ARALIA NUDICAULIS.....	71
FIGURE 17 - CCM RECAPITULATIVE DU FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION ACOET SUR RESINE DIAION HP-20 – CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (26:14:3) – NP-PEG (365NM).....	74
FIGURE 18 - ORGANIGRAMME DE FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION ACOET.....	75
FIGURE 19 - CHROMATOGRAMME HPLC (280NM) DE LA FRACTION EFPC.....	76
FIGURE 20 - MESURE DU POURCENTAGE D'INHIBITION DE L'ACTIVITE DE LA COLLAGENASE	78
FIGURE 21 - MESURE DU POURCENTAGE D'INHIBITION DE L'ACTIVITE DE L'ELASTASE	79
FIGURE 22 - ÉVALUATION DE LA STIMULATION DE PRODUCTION D'ELASTINE SUR WS-1	80
FIGURE 23 - ÉVALUATION DE LA STIMULATION DE PRODUCTION D'INVOLUCRINE SUR HACAT.....	81

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 - UTILISATIONS MEDICINALES TRADITIONNELLES DES ARALIAS PAR LES AMERINDIENS (MOERMAN 2009).....	19
TABLEAU 2 - PROPRIETES BIOLOGIQUES REPERTORIEES DANS LA LITTERATURE POUR LE GENRE ARALIA.....	21
TABLEAU 3 - CONCENTRATION EN PHENOL TOTAUX DANS DES ALIMENTS SELECTIONNES.....	25
TABLE 4 - CALIBRATION CURVES, LINEARITY, LIMITS OF DETECTION (LOD) AND LIMITS OF QUANTIFICATION....	38
TABLE 5 - INTRA-DAY AND INTER-DAY PRECISION AND ACCURACY RESULTS.....	38
TABLE 6 - QUANTIFICATION OF PHENOLIC ACIDS IN THE EXTRACTS FROM ARALIA NUDICAULIS.....	39
TABLE 7 - ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF EFPC AND PHENOLIC STANDARDS.....	42
TABLEAU 8 - ACTIVITES CYTOTOXIQUES DES EXTRAITS SUCCESSIFS DES RHIZOMES D'ARALIA NUDICAULIS L.....	63
TABLEAU 9 - ACTIVITES ANTIOXYDANTES ET ANTI-INFLAMMATOIRES DES EXTRAITS SUCCESSIFS DES RHIZOMES D'ARALIA NUDICAULIS L.....	63
TABLEAU 10 - DONNEES RMN DU COMPOSE QL01030I.....	72
TABLEAU 11 - DONNEES RMN DU COMPOSE QL01030B.....	72
TABLEAU 12 - DONNEES RMN DU COMPOSE QL01030H.....	73

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 - SUPERPOSITION CHROMATOGRAMMES EFPC (BLEU) ET STANDARDS : PA (ROUGE), CHA (VERT) ET CA (ROSE) - 280 NM.....	97
ANNEXE 2 - SUPERPOSITION CHROMATOGRAMME EFPC (BLEU) ET STANDARD D'ACIDE P-COUMARIQUE (ROUGE) - 350NM	97
ANNEXE 3 - SPECTRES MS DES COMPOSES PHENOLIQUES MAJORITAIRES ET DES STANDARDS.....	99
ANNEXE 4 - COURBE DE CALIBRATION PAR HPLC DES STANDARDS D'ACIDES PHENOLIQUES.....	101
ANNEXE 5 - TABLEAU RECAPITULATIF DES ACTIVITES ANTIOXIDANTES ET ANTI-INFLAMMATOIRES DES EXTRAITS BRUTS	103

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Introduction

La médecine traditionnelle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme étant la somme de toutes les connaissances et pratiques, explicables ou non, permettant la prévention, le diagnostic et l'élimination de divers troubles et maladies. Les remèdes traditionnels ont souvent été développés à partir d'observations utilisant de multiples ressources naturelles telles que : les plantes, les parties animales, les insectes ou les minéraux. Les produits naturels utilisés en médecine traditionnelle sont fortement avantageux, par leur diversité chimique mais également par l'existence de nombreuses données cliniques. C'est pourquoi, cette diversité couplée aux différentes avancées technologiques modernes permet d'ouvrir le champ des possibilités aux différents traitements et moyens de prévention.

Le *Ginseng* demeure l'une des meilleures preuves de cet attrait, avec des retombées économiques allant jusqu'à 1 130 M\$, ainsi que plus de 9000 publications scientifiques rapportant des activités d'extraits complexes jusqu'aux activités spécifiques de marqueurs chimiques isolés de diverses espèces de *ginseng* (Baeg et So 2013). En se basant sur les connaissances en marqueurs chimiques et biologiques d'espèces d'intérêt thérapeutique telles que les *Ginseng*, la pharmacognosie a pour rôle d'orienter les recherches vers de nouveaux produits de santé naturels. Celle-ci se base principalement sur la phylogénie des espèces ainsi que les différentes utilisations en médecine traditionnelle.

De nombreuses espèces des genres *Panax* ont donc été étudiées et comparées à la recherche de molécules ou d'activités analogues aux espèces officinales. L'étude s'est ensuite élargie aux espèces appartenant non plus aux genres *Panax*, mais à différents genres de la famille des Araliaceae. L'un des meilleurs exemples est l'*Eleutherococcus senticosus*, également surnommé improprement le *Ginseng* de Sibérie pour ses effets biologiques fortement similaires aux différents *Ginsengs*.

Le genre *Aralia* riche en diversité d'espèces et répandu sur une grande surface du globe, est lui aussi fortement étudié pour l'investigation de nouveaux composés naturels biologiquement actifs (Tableau 2). Le genre *Aralia* se retrouve au Canada à travers 3 espèces endémiques : *Aralia nudicaulis* L., *Aralia hispida* Vent. ainsi que *Aralia racemosa* L.. Des résultats préliminaires, ainsi que l'abondance avérée au sein la forêt boréale, ont permis

d'orienter ce projet vers l'étude de l'*Aralia nudicaulis* L.. De plus, tel que décrit dans le tableau 1, près de 20 tribus amérindiennes utilisaient traditionnellement cette espèce contre divers maux. Ces différents usages s'effectuent en grande majorité à partir des rhizomes. Deux groupes de recherche se sont concentrés sur les activités anti-mycobactériale (Webster *et al.* 2010) et cytotoxique (Wang *et al.* 2006) de cette espèce, mais le reste des différents usages traditionnels n'a jamais fait l'objet d'études scientifiques.

Le laboratoire LASEVE possède une grande expertise en termes d'études phytochimiques basées principalement sur l'ethnobotanique. Les principales cibles sont donc de nouveaux composés naturels biologiquement actifs présents majoritairement au sein d'espèces endémiques du Québec. Pour ce faire, de nombreuses techniques d'extraction, de séparation, de purification et d'identification sont utilisées. Depuis plusieurs années, le laboratoire s'intéresse à la valorisation d'extraits riches en composés phénoliques pour le développement de différents produits biopharmaceutiques (cosmétiques, phytomédicaments, etc.).

Le présent projet s'inscrit donc dans cette optique, consistant à étudier la composition chimique et l'activité biologique des différents extraits de rhizomes d'*Aralia nudicaulis*, ou fausse salsepareille. L'identification précise et la quantification des composés phénoliques majoritaires des extraits enrichis restent des étapes cruciales pour ce projet. Pour diversifier l'étude, différents marqueurs chimiques et biologiques seront quantifiés à travers différents stades de végétation afin de connaître leur dynamique au sein de l'espèce. Les fractions enrichies en saponines triterpéniques seront également partiellement étudiées.

1.1.1 Objectif général et objectifs spécifiques

L'objectif général de ce projet vise l'identification et quantification des composés biologiquement actifs dans les rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L.

De nombreux objectifs spécifiques ont alors été énoncés afin de parvenir à atteindre cet objectif général. Tout d'abord, la mise en place d'une méthode d'extraction des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* a été nécessaire pour l'obtention de divers extraits.

Ensuite, l'extrait méthanolique a du fractionnement pour l'obtention d'une fraction enrichie en composés phénoliques. Ceux-ci ayant par la suite été identifiés et quantifiés. De plus, un suivi de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire a été nécessaire afin d'évaluer le potentiel des fractions enrichies en composés phénoliques. Suite à certains résultats préliminaires, il a été établi d'évaluer le potentiel inhibiteur sur la production de ROS induite par les UVB et IRA, des fractions d'intérêts.

Enfin, l'isolation, la purification et l'identification de composés majoritaires d'une fraction enrichie en saponines triterpéniques ont également fait l'objet d'une étude.

1.1.2 Division du mémoire

Le chapitre 2 de ce mémoire s'avère être une revue de littérature utile à la mise en place de ce projet. Elle traite séquentiellement de la famille des Araliaceae (Juss.), du genre *Aralia* et enfin de l'*Aralia nudicaulis* L.. L'ensemble des usages traditionnels amérindiens, ainsi que les études scientifiques menées à ce jour sur les espèces considérées sont répertoriées dans ce chapitre. Une portion de ce chapitre est également consacrée aux composés phénoliques, ainsi que les activités biologiques qui leurs sont associées spécifiquement face à l'activité pro-oxydante liée aux irradiations UVB et IR.

Le chapitre 3 présente l'article scientifique écrit au cours de ce projet, rapportant l'intégralité des travaux effectués sur les composés de nature phénolique. L'effet protecteur de l'extrait face à la production de ROS induit par les UVB et IRA est également présenté dans cette section. Cet article sera soumis dans le journal de grande renommée : *Journal of Natural Products*.

Le chapitre 4 porte dans un premier temps, sur les méthodes d'échantillonnage et d'extractions accompagnées d'un criblage biologique, puis dans un second temps, sur les résultats de l'étude partielle des composés de nature triterpénique, et enfin, sur les travaux concernant les composés phénoliques et autres tests d'activités cosmétiques non présentés au sein de l'article.

Enfin, la conclusion générale de ce projet de maîtrise sera présentée ainsi que les perspectives d'avenir qui y sont liées.

Les annexes visent à regrouper l'ensemble des données ou figures n'ayant pas pu être insérées dans le corpus, mais toutefois pertinentes à ce mémoire.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Des Araliaceae à l'*Aralia nudicaulis* L.

2.1.1 Les ARALIACEAE

La famille des Araliaceae (Juss.) est l'une des plus importantes familles de la classe des angiospermes (plantes à floraison), se composant de 40 genres subdivisés en près de 1500 espèces. Celles-ci sont principalement originaires des régions tropicales, mais se retrouvent parfois dans les régions tempérées du globe (The Plant List 2013).

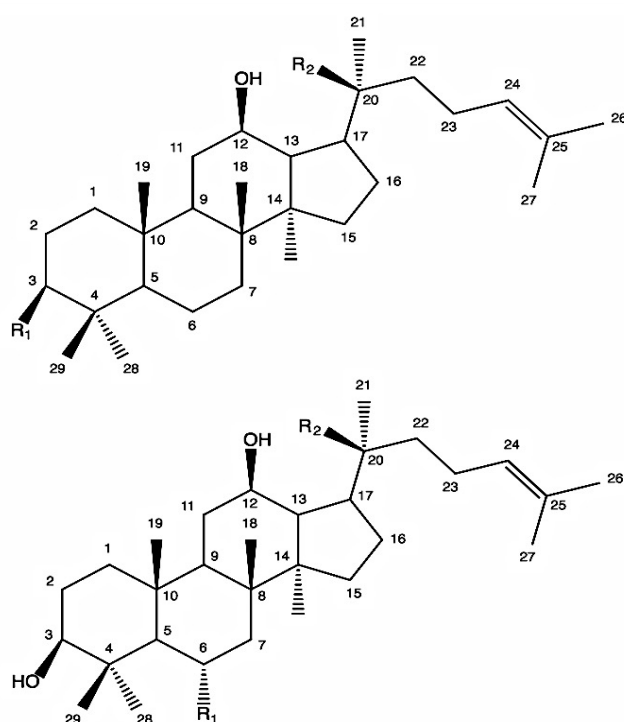
Les Araliaceae sont présentes principalement en tant qu'herbacées mais également sous d'autres formes incluant quelques arbres, arbustes et lierres. Par les canaux sécréteurs parcourant l'appareil végétatif, ces espèces présentent souvent des huiles essentielles ou gomme-résines parfois très aromatiques. Les feuilles sont relativement grandes et très diversifiées dans leur composition : pennées, bipennées, tripennées ou digitées. Les petites fleurs hermaphrodites et pédicellées sont en majorité réparties sous forme d'ombelles, parfois en épis ou encore en faisceaux d'épis. Le fruit est une drupe (ou « pseudo-drupe ») ou une baie (Wen *et al.* 2001).

Parmi l'ensemble des Araliaceae, on retrouve de nombreuses activités biologiques répertoriées et utilisées au sein de médecines autant traditionnelles que modernes. Les genres *Eleutherococcus* (Panossian *et Wikman* 2010) et *Panax* comptent parmi les plus connus pour leur présence dans de nombreuses pharmacopées et leurs nombreux dérivés thérapeutiques sur le marché actuel (Attele *et al.* 1999; Rege *et al.* 1999).

Le genre *Panax*, ayant pour origines étymologiques le grec avec « pan » et « axos » signifiant respectivement « tout » et « traiter », reste le genre le plus étudié avec près de 8000 articles scientifiques à son sujet à ce jour (Leung *et Wong* 2010; Chen *et al.* 2015). Les *ginsengs* sont généralement des plantes vivaces originaires d'Asie du Nord-Est connaissant un engouement sur le continent américain dans les dernières décennies. Leur utilisation était autrefois alimentaire, mais depuis près de 300 ans, ceux-ci sont très réputés pour leurs propriétés thérapeutiques et constituent une référence dans de nombreuses pharmacopées telle que la pharmacopée asiatique (Singh 2010; Chen *et al.* 2015).

Les *ginsengs* les plus connus sont le *Panax ginseng* C. A. Meyer (ginseng asiatique) ainsi que le *Panax quinquefolium* L. (ginseng américain). Le *Panax ginseng* est cultivé en Chine, Japon, Corée et Russie, tandis que les cultures de *Panax quinquefolium* L. se retrouvent aux États-Unis et Canada. Le *Panax quinquefolium* a été utilisé durant des centaines d'années par les populations amérindiennes, et demeure de nos jours, le supplément nutritionnel naturel le plus utilisé au monde (Jian-Ming et Qizhi Yao and Changyi 2009).

Plusieurs effets thérapeutiques sont associés à ces deux espèces de *ginseng*, allant de l'activité anti-âge à l'activité anti-diabétique en passant par l'activité anticancéreuse, analgésique, anti-inflammatoire ou encore visant à améliorer les fonctions hépatiques (Kitts et Hu 2000; Lee 2000; Choi 2008; Chen *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2016). Néanmoins, les suppléments nutritionnels actuels à base d'extraits de *ginsengs* sont principalement consommés pour les effets sur le stress, la fatigue, la concentration et le système immunitaire, ces activités étant généralement regroupées sous le terme d'activité « adaptogène » (Nocerino *et al.* 2000; Singh 2010). Cette activité étant définie par Brekhman en 1980 comme étant la capacité « d'augmenter la résistante de l'organisme de manière non spécifique contre les agressions extérieures physiques, chimiques ou biologiques et d'avoir une influence normalisatrice tout en montrant une absence de toxicité » (Brekman 1980).



Ginsenoside	R1 (C-3)	R2 (C-20)
Rb	Glu (1→2) Glu-	Glu (1→6) Glu-
Rd	Glu (1→2) Glu-	Glu-
F2	Glu-	Glu-
Compound-K	H-	Glu-
Rg3	Glu (1→2) Glu-	H-
Rh2	Glu-	H-

Ginsenoside	R1 (C-6)	R2 (C-20)
Re	Rha (1→2) Glu-	Glu-
Rg1	Glu-	Glu-
Rh1	Glu-	H-
F1	H-	Glu-
Aglycon-PPT	H-	H-

Figure 1 - Structures des ginsenosides majoritaires isolés du *Panax ginseng* C.A.Mey.

Les composés à l'origine de cette activité « adaptogène » sont des molécules appelées ginsenosides. Celles-ci possèdent une structure de glycosides de saponines triterpéniques de type dammarane (Leung et Wong 2010).

2.1.2 Le genre *Aralia*

Le genre *Aralia* est composé de 74 espèces herbacées, arbustives, arborescentes ou parfois grimpantes. La plupart des espèces sont pubescentes avec de simples trichomes ; certaines espèces ont des trichomes ramifiés ; d'autres sont glabres. Les feuilles sont majoritairement bipennées, mais parfois tripennées ou épinglées ; toutes ont des stipules et un rachis articulé. Les fleurs se produisent dans les ombelles ou parfois dans les têtes, qui sont, à leur tour, agrégées dans une panicule simple ou ombellée (Wen 1993).

L'espèce la plus étudiée est l'*Aralia elata* (Miq.) Seem., une espèce endémique de l'Asie de l'Est. De nombreux groupes de recherche ont démontré son effet sur le système immunitaire (V. Miroshnichenko *et al.* 1985), les fonctions reproductives (Denisenko *et al.* 2000) ainsi que les stress environnementaux de par son activité « adaptogène » (Wojcicki J 1977; Yance et Tabachnik 2007). De plus, on retrouve dans la littérature de nombreuses études sur des espèces différentes du genre *Aralia*, principalement étudiées par des groupes de recherche asiatiques. L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence la diversité des familles de molécules conférant les multiples activités biologiques aux espèces de ce genre (Tableau 2).

Quelques études ont visé à standardiser différentes espèces d'*Aralia* telles que : *Aralia taibaiensis* (Dou et al. 2013; Weng et al. 2014a), *Aralia racemosa* (Prasanth et al. 2017), *Aralia elata* (Sun et al. 2017) et *Aralia mandshurica* (Shikov et al. 2016; Kurkin et Ryazanova 2018). Ces standardisations sont basées principalement sur les concentrations en saponines mais parfois également sur les concentrations en composés phénoliques.

La pharmacopée Russe (Russian Pharmacopoeia 2013) rapporte la standardisation des aralosides dérivés de l'acide oléanolique dans l'*Aralia mandshurica*. La standardisation de l'*Aralia racemosa* par la pharmacopée française est basée quant à elle sur la quantification de l'acide chlorogénique (French Pharmacopoeia 2009).

Seulement 3 espèces d'*Aralia* ont été répertoriées en Amérique du Nord incluant : l'*Aralia nudicaulis* L., l'*Aralia hispida* Vent. ainsi que l'*Aralia racemosa* L.. Cette dernière espèce est bien moins répandue au sein de la forêt boréale, celle-ci a donc été préalablement exclue, puis l'étude s'est finalement concentrée sur l'espèce la plus abondante : l'*Aralia nudicaulis* L. (Figure 2) (Desmet et Brouillet 2013). Différentes analogies pourront être établies entre les espèces thérapeutiques telles qu'*Aralia elata*, *Aralia cordata* et *Aralia mandshurica* et l'*Aralia nudicaulis*.

De nombreuses tribus amérindiennes, telles que les Algonquins, les Potawatomis, les Chippewas et les Iroquois ont longtemps utilisé certaines espèces d'*Aralia* endémiques de l'Amérique du Nord et leur ont associé de nombreuses vertus (Tableau 1).



Figure 2 - Aire de répartition de l'*Aralia nudicaulis* (Bleu) et de l'*Aralia hispida* (Vert) au Canada

Tableau 1 - Utilisations médicinales traditionnelles des *Aralias* par les Amérindiens (Moerman 2009)

Espèce	Partie utilisée	Usage	Forme	Nations
<i>Aralia californica</i> S. Wats.	Rhizomes	Troubles dermatologiques	Décoction	Pomo
		Troubles pulmonaires		Kashaya
		Douleurs stomacales		Mendocino
		Tuberculose		
<i>Aralia hispida</i> Vent.	Rhizomes	Troubles cardiaques	Infusion	Algonquin
		Tonifiant	Non-précisée	Potawatomi
		Régulateur		
<i>Aralia nudicaulis</i> L.	Rhizomes	Tonifiant sanguin	Infusion	Cherokee Abnaki
		Purificateur sanguin	Infusion	Iroquois
			Décoction	Okanagon Thompson
		Hémostatique	Cataplasme	Chippewa Kwakiult
		Menstruations	Décoction	Chippewa
		Troubles dermatologiques	Cataplasme	Chippewa
				Potawatomi
				Iroquois Woodlands
		Brûlures	Cataplasme	Meskwaki
		Troubles rénaux	Infusion	Algonquin
		Douleurs stomacales	Décoction	Bella Coola Iroquois
		Anti-tussif	Infusion	Micmac Penobscot
		Tuberculose	Infusion	Iroquois
		Tonifiant	Non-précisée	Delawara
			Décoction	Mohegan Thompson
		Stimulant	Infusion	Montagnais Ojibwa
			Décoction	Thompson Meskwaki
		Dentifrice (<i>désinfectant</i>)	Décoction	Woodlands
	Plante entière	Pneumonie pédiatrique	Décoction	Woodlands
	Fruits	Stimulant lactation	Décoction	Woodlands
	Feuilles	Anti-convulsif	Infusion	Ojibwa

<i>Aralia racemosa</i> L.	Rhizomes et tiges	Purificateur sanguin	Décoction	Iroquois
	Rhizomes			Menominee
	Rhizomes	Hémostatique	Non-précisée	Meskwaki
	Plante entière			Penobscot
			Infusion	Cherokee
	Rhizomes et tiges	Menstruations	Décoction	Chippewa
			Non-précisée	Micmac
			Décoction	Iroquois
				Cherokee
	Rhizomes	Troubles dermatologiques	Cataplasme	Chippewa
				Iroquois
	Rhizomes	Brûlures	Cataplasme	Cherokee
	Rhizomes		Non-précisée	Micmac
	Rhizomes et tiges	Troubles rénaux	Décoction	Iroquois
	Plante entière		Infusion	Malecite
		Troubles gastro-intestinaux	Décoction	Choctaw
			Infusion	Iroquois
			Non-précisée	Cherokee
		Anti-tussif	Décoction	Chippewa
			Infusion	Iroquois
				Micmac
		Troubles respiratoires	Décoction	Iroquois
			Non-précisée	Cherokee
<i>Aralia spinosa</i> L.	Rhizomes	Tuberculose	Infusion	Algonquin
				Malecite
			Décoction	Iroquois
			Non-précisée	Meskwaki
			Décoction	Choctaw
		Analgésique	Infusion	Malecite
			Infusion	Menominee
			Non-précisée	Micmac
			Non-précisée	Cherokee
		Décontractant musculaire	Décoction	Chippewa
				Iroquois
	Rhizomes et fruits		Infusion	Cherokee
	Rhizomes	Tonifiant	Décoction	Iroquois
<i>Aralia racemosa</i> L.			Infusion	Penobscot
	Rhizomes et fruits	Stimulant	Non-précisée	Choctaw
	Rhizomes			Micmac
			Non-précisée	Choctaw
		Troubles dermatologiques	Onguent	Cherokee
			Décoction	Rappahannock
	Rhizomes	Vomitif	Infusion	Cherokee
		Décontractant musculaire	Non-précisée	Cherokee
<i>Aralia racemosa</i> L.		Anti-pyrétique	Décoction	Rappahannock

Tableau 2 - Propriétés biologiques répertoriées dans la littérature pour le genre *Aralia*

Espèce	Partie utilisée	Propriétés biologiques	Famille de composés
<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.	Feuilles	Cytotoxicité Hépatoprotecteur Anti-diabète	Saponines triterpéniques Aralia-Saponin V et VI Congmunoside B, II, IV, V et X Congmuyenoside II(Guo <i>et al.</i> 2009; Wu <i>et al.</i> 2012; Wang <i>et al.</i> 2015)
<i>Aralia decaisneana</i> Hance	Rhizomes	Anti-diabète	Saponines (oléanane et ursane)(Miyase <i>et al.</i> 1996)
<i>Aralia continentalis</i> Kitag.	Rhizomes	Anti-inflammatoire Anti-microbial Anti-bactérien	Diterpènes (acides continentales)(Kim <i>et al.</i> 2014; Lee <i>et al.</i> 2015)
	Feuilles	Antioxydant	Flavonoïdes(Wei-yan Ju et Bing-Chao Li 2012)
<i>Aralia cordata</i> Thunb.	Rhizomes	Cytotoxicité Analgésique Anti-thrombotique Anti-fongique Alzheimer Anti-inflammatoire Antioxydant	Polyacétylènes(Kim <i>et al.</i> 2013b) Polyphénols et terpènes(Hyun <i>et al.</i> 2010; Kim <i>et al.</i> 2013b)
<i>Aralia echinaculis</i> Hand.-Mazz.	Rhizomes	Arthrite Troubles osseux Anti-inflammatoire Antioxydant	Aralia-Saponins et Glycoside de Lignanes(Li <i>et al.</i> 2016; Li <i>et al.</i> 2017a) Flavonoïdes(Lingpeng Pei 2010; Lingpeng Pei 2011; Lingpeng Pei et Jia Zhu 2011; Xia Yin 2011)
<i>Aralia taibaiensis</i> Z.Z.Wang & H.C.Zheng	Rhizomes et écorces	Stimulation production d'insuline Anti-hyperglycémique Anti-glycation Hypolipidémique	Saponines triterpéniques(Cui <i>et al.</i> 2013; Weng <i>et al.</i> 2014b; Duan <i>et al.</i> 2016; Li <i>et al.</i> 2017b)
<i>Aralia racemosa</i> L.	Rhizomes	Adaptogène Stress	Diterpènes et Acides phénoliques(Clement <i>et al.</i> 2013)
<i>Aralia nudicaulis</i> L.	Rhizomes	Anti-mycobactérienne Anti-tuberculose Cytotoxicité	Falcarinol et Panaxydol(Li <i>et al.</i> 2012) Polyacétylènes(Wang <i>et al.</i> 2006)

2.1.3 L'*Aralia nudicaulis* L.

L'*Aralia nudicaulis* L. est une espèce indigène de l'Amérique du Nord, trouvée de manière abondante sur l'ensemble du continent, principalement dans la forêt boréale ou mixte (Barrett et Helenurm 1981) (Figure 2). Le nom commun de l'*Aralia nudicaulis* est « Wild sarsaparilla » ou « fausse salsepareille ».

Cette plante vivace possède des feuilles caduques réparties en 3 à 5 folioles ovales, pointues et finement dentées sur trois principales tiges. Une dernière tige sans feuilles porte une ombelle composée de fleurs verdâtres, se développant en petites baies noires (Figure 3).

La majeure partie de l'activité métabolique ainsi que l'activité reproductrice de l'espèce se retrouve dans les longs rhizomes souterrains pouvant atteindre jusqu'à 1 mètre à partir de l'individu (Flanagan et Bain 1988).

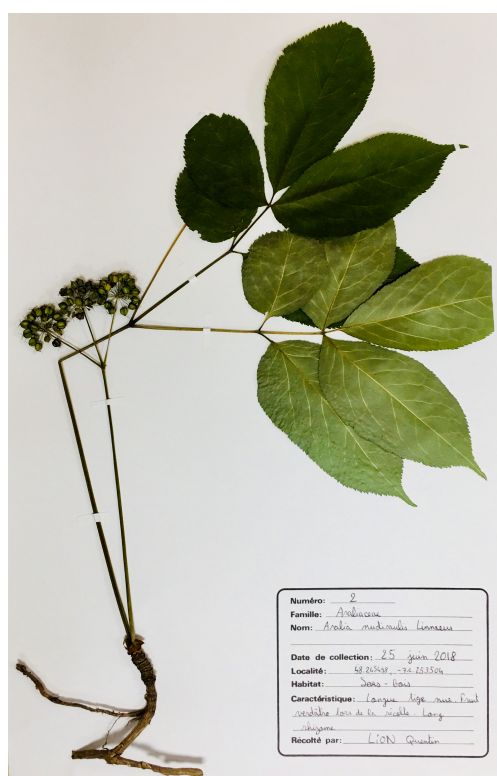


Figure 3 - *Aralia nudicaulis* L. - Louis-Marie Herbarium, Université de Laval (Québec, Canada)

Cette espèce est depuis longtemps utilisée par les premières nations autochtones avec 79 concordances dans l'American Ethnobotany Database (Lacey 1993). Les usages traditionnels répertoriés pour l'*Aralia nudicaulis* sont nombreux et regroupent le traitement des plaies et d'infections, la purification du sang et la protection hépatique. Les populations

Mi'kmaqs, faisaient bouillir les racines dans de l'eau avant de les appliquer sur les plaies ou les infections. Des infusions de rhizomes séchés étaient également utilisées pour lutter contre la grippe (Lacey 1993).

Malgré l'usage abondant de l'*Aralia nudicaulis* en Amérique du Nord, très peu de recherches portent sur ses effets médicinaux. Un groupe de recherche canadien a exploré les propriétés anticancéreuses d'extrait d'*Aralia nudicaulis*, et ils ont découvert que les rhizomes et les fruits montraient des effets remarquables sur certaines lignées de cellules cancéreuses ainsi qu'une toxicité significativement faible sur les lignées de cellules saines (Wang *et al.* 2006). Toutefois, cette activité est associée à un extrait hexane n'ayant pas été fractionné et dont la composition n'ayant pas été identifiée clairement.

Cette espèce a également été examinée pour l'activité anti-mycobactérienne contre le *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium tuberculosis* et un effet significatif a été relevé contre *M. tuberculosis* (Webster *et al.* 2010). Les principaux responsables de cette activité sont des composés, présentés ci-dessous (Figure 4), de la famille des polyacétylènes (Li *et al.* 2012).

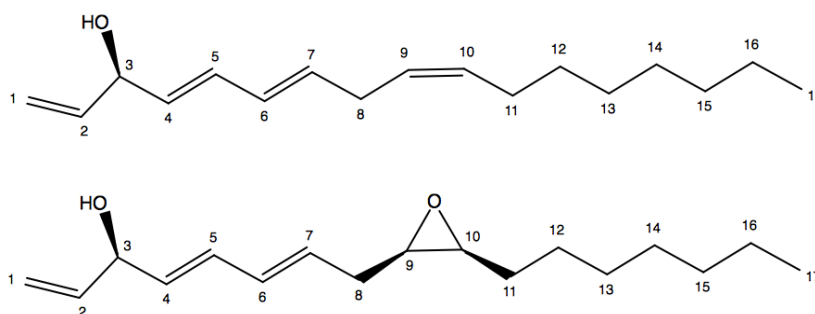


Figure 4 - Structures des polyacétylènes (3*R*)-falcarinol (1) et (3*R*,9*R*,10*S*)-panaxydol (2) isolés de l'*Aralia nudicaulis* L.

2.2 Molécules d'intérêts et activités biologiques associées

2.2.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques (PCs), également connus sous le nom de polyphénols, constituent l'un des plus complexes et omniprésents groupes de métabolites chez les végétaux. Ils sont dérivés de la voie de biosynthèse des pentoses phosphates, shikimates et phénylpropanoïdes (Randhir *et al.* 2004).

Ces composés possèdent un noyau aromatique lié à un ou plusieurs groupements hydroxyles, le reste de la structure varie énormément allant d'un simple acide phénolique jusqu'à un polymère plus complexe ayant un poids moléculaire plus élevé tel que de la lignine (Figure 5) (Velderrain-rodriguez *et al.* 2014). Les flavonoïdes avec leur structure C₆-C₃-C₆, constituent plus de la moitié des 8000 composés phénoliques différents. De nombreux glycosides de polyphénols sont également retrouvés dans la nature.

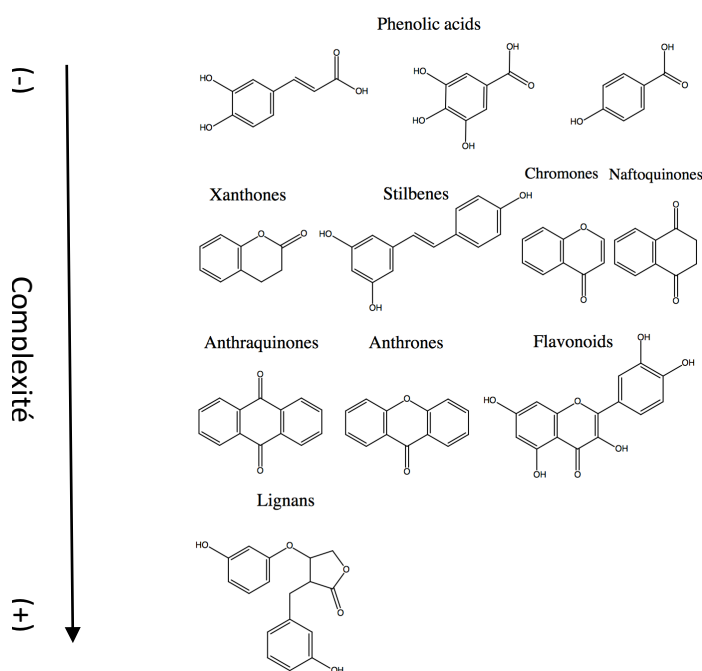


Figure 5 - Complexité des classes de composés phénoliques les plus communs dans les végétaux

Les composés phénoliques sont souvent essentiels à de nombreuses fonctions chez la plante allant de la croissance et la reproduction jusqu'au développement de résistances envers certains pathogènes et prédateurs. Les composés phénoliques peuvent agir en tant

que phytoalexines ou encore en augmentant l'astringence, rendant alors leur consommation moins agréable par les prédateurs (Bravo 1998). Ces composés influencent également la morphologie, par exemple la pigmentation de certains organes chez la plante (Alasalvar *et al.* 2001).

Leur consommation quotidienne peut provenir de multiples sources (Tableau 3) et s'élève en moyenne à 1 g par personne (Giada 2013). Les composés phénoliques font l'objet de nombreuses recherches à travers le monde pour leurs effets sur l'organisme humain.

Tableau 3 - Concentration en composés phénoliques totaux dans des aliments sélectionnés

	Source	Concentration phénol totaux (mg/100g)
Fruits	Orange	1343
	Pamplemousse	893
	Citron	843
	Kiwi	791
	Lime	751
	Myrtille	362
	Fraise	199
	Pomme	125
Légumes	Chou rouge	186
	Pomme de terre	150
	Épinard	112
	Laitue	107
Céréales	Germe de soja	414
	Avoine	352
	Farine de blé	184
Condiments	Basilic	4425
	Échalote	1718
	Poivre noir	1600
	Menthe	400
Boissons	Vin rouge	242
	Café	188
	Thé vert	83
	Thé noir	62

2.2.2 Les composés phénoliques dans le genre *Aralia*

Les *Aralias* sont connues pour leurs triterpènes originaux leur conférant des propriétés biologiques spécifiques. Toutefois, les espèces de ce genre regorgent également de composés phénoliques contribuant à de nombreuses activités biologiques telles que les activités antioxydante, anti-stress, anti-inflammatoire et « adaptogène ». Comme énoncé précédemment, les composés phénoliques sont parfois utilisés à des fins de standardisation d'espèces d'*Aralia*, comme l'*Aralia racemosa* standardisée à l'aide de l'acide chlorogénique par la pharmacopée française. Une liste des composés phénoliques retrouvés dans les *Aralias* à ce jour est dressée dans la figure ci-dessous (Saito *et al.* 1990; Sun Kim *et al.* 1998; Hyun *et al.* 2010; Lee *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011; Kim *et al.* 2013a).

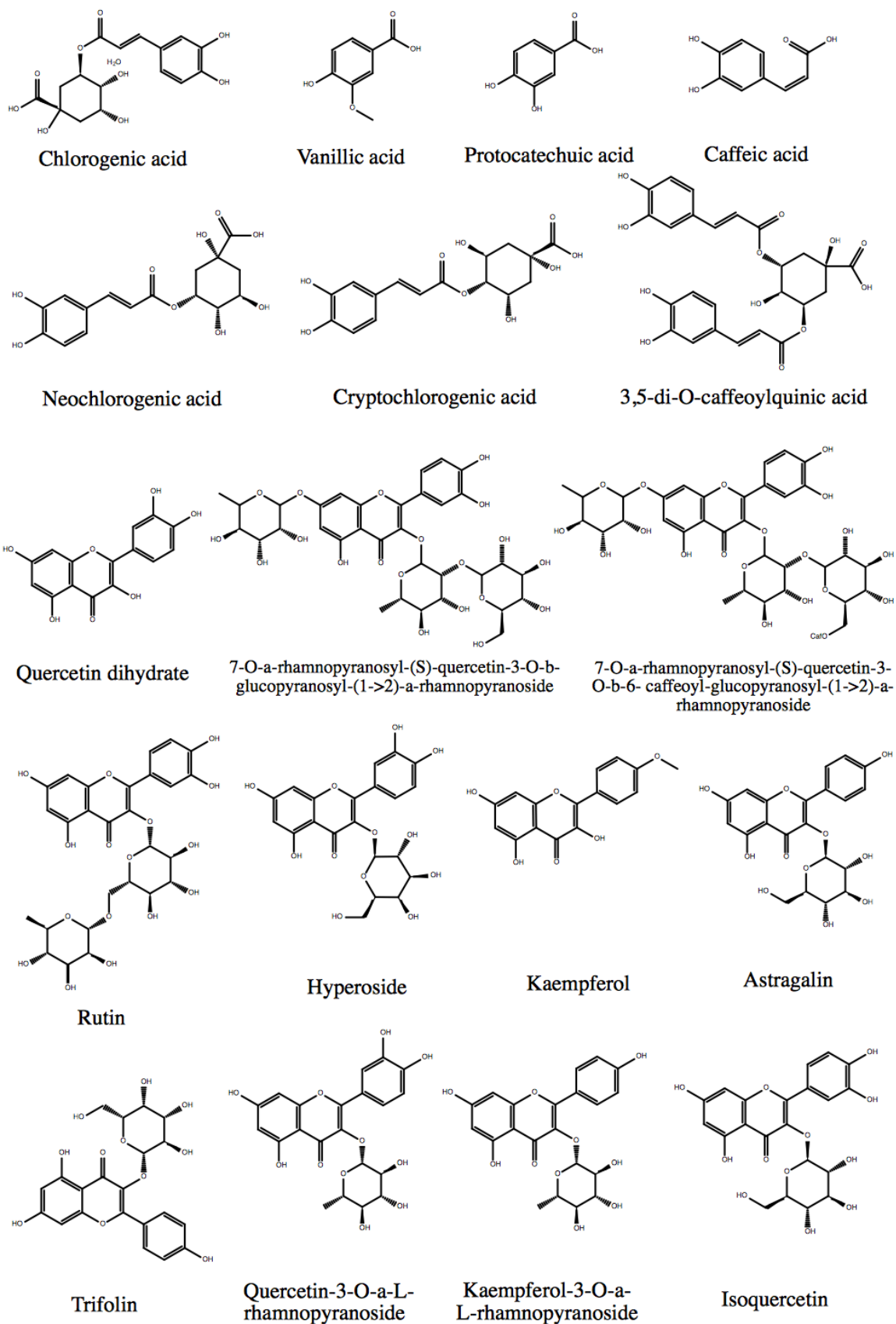


Figure 6 - Composés phénoliques identifiés dans le genre *Aralia*

2.2.3 L'activité antioxydante des composés phénoliques

Le stress oxydatif peut être défini comme une perturbation de l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants, ou bien par la formation excessive de pro-oxydants (Poljsak *et al.* 2013). Les pro-oxydants, font très souvent référence aux « Reactive Oxygen Species » (ROS), ceux-ci pouvant être décrits comme des radicaux comprenant au moins un électron non-pairé dans sa couche de valence externe, ou bien des non-radicaux très réactifs. Ces espèces chimiques peuvent causer de graves dommages aux lipides, à l'ADN, aux protéines et aux mécanismes de protection des cellules (Kohen et Nyska 2002). Les antioxydants sont donc considérés comme des composés ayant la capacité de prévenir le processus de pro-oxydation et les dommages causés par l'oxydation biologique (Prior et Cao 1999).

Le corps humain possède son propre mécanisme de défense contre les différents stress oxydatifs en produisant des antioxydants endogènes tels que : la superoxide dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Cependant, ces mécanismes ne fonctionnent pas toujours de manière optimale, c'est pourquoi les polyphénols représentent un apport indispensable.

Les polyphénols sont les composés antioxydants les plus abondants au sein de la diète chez l'humain. Cette activité est principalement due à la présence de groupements hydroxyles ainsi qu'au noyau aromatique conjugué. Ces composés peuvent facilement être oxydés et donc être modifiés en quinones. Les formes intermédiaires sont des radicaux phenoxy très réactifs, stabilisés par la délocalisation d'un électron non-pairé dans le noyau aromatique (Puzanowska-Tarasiewicz *et al.* 2009; Kang *et al.* 2011). Ils peuvent alors se lier à des radicaux libres commençant par les radicaux hydroxyles et les radicaux superoxydes, puis finissant par les radicaux lipidiques (Figure 7)(Potargowicz *et al.* 2005).

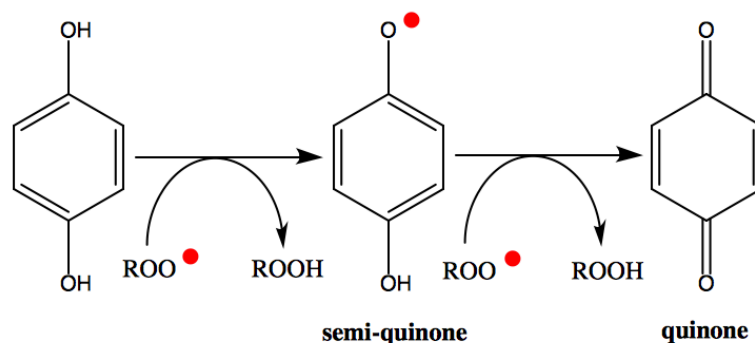


Figure 7 - Mécanisme antioxydant des composés phénoliques

Ils peuvent également chélater des ions métalliques issus de réactions enzymatiques d'oxydations ainsi qu'inhiber des oxydases ou encore de nombreuses réactions radicalaires en chaîne. Toutefois, le mécanisme le plus intéressant demeure celui de stabiliser ou de délocaliser un électron non-pairé ou un ROS modifié, dans un système bien moins réactif par hydrogénation ou par complexation de celui-ci (Potargowicz *et al.* 2005; Puzanowska-Tarasiewicz *et al.* 2009).

De plus, les polyphénols sont étudiés pour différentes autres propriétés biologiques associées à de nombreuses maladies contemporaines telles que :

- **Les maladies cardiovasculaires** (Augmentation Pression sanguine ; augmentation HDL et diminution LDL et cholestérol total) (Bogdanski *et al.* 2012; Khan *et al.* 2012; Moreno-Luna *et al.* 2012; Di Renzo *et al.* 2013; Terauchi *et al.* 2014).
- **Certaines formes de cancer** (colon (Yuan *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2015), sein (Jin *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2015), foie, pancréas (Zhao *et al.* 2015), gastrique (Liang *et al.* 2014), oral et cervical (Tsai *et al.* 2016)).
- **Le diabète** (Augmentation sensibilité à l'insuline et l'hyperglycémie (Takikawa *et al.* 2010), diminution cholestérol/triglycéride/glucose sanguin, perte de poids (Yin *et al.* 2011), synergie avec antidiabétique (Prabhakar et Doble 2009)).
- **L'obésité** (inhibition de lipases pancréatiques et absorption lipidique (Uchiyama *et al.* 2011), inhibition différenciation préadipocytes (Chang *et al.* 2016), perte de poids (Klaus *et al.* 2005) et prévention de maladies connexes (Noratto *et al.* 2015)).
- **Troubles de la vision** (Troubles de l'épithélium rétinien) (Milbury *et al.* 2007; Xu *et al.* 2010)

- **Amélioration de la mémoire** (Krikorian *et al.* 2010)
- **Amélioration des capacités intellectuelles** (Papandreou *et al.* 2009)
- **Anti-inflammatoire** (Chen *et al.* 2012b)
- **Antiallergique** (Chen *et al.* 2012a)

2.2.4 L'activité pro-oxydante liée aux irradiations UVB et IR

Le vieillissement de la peau est causé par différents facteurs endogènes, mais également exogènes. Les facteurs exogènes tels que les irradiations solaires, la pollution de l'air, la consommation de tabac, le manque de sommeil ou encore la température, constituent l'exposome du vieillissement cutané (Krutmann *et al.* 2017). Au travers de ces nombreux facteurs, les irradiations solaires restent les principales contributrices dans le processus de vieillissement et de cancer de la peau. Le spectre solaire étant composé de radiation ultraviolet (UV), infrarouge (IR) et visible.

L'UV est divisé en UVC (<290nm), UVB (290-315nm) et UVA (315-400nm). Les UVC sont absorbés dans leur intégralité par l'atmosphère, tandis que les UVA et UVB atteignent la surface terrestre et permettent la synthèse de vitamine D. Cependant, ceux-ci sont associés à de nombreux effets physiologiques négatifs tels que l'inflammation ou le vieillissement cutané. Le rôle des UVB dans de nombreux troubles topiques, incluant les cancers de la peau, a bien été établi au travers de diverses études scientifiques. Les radiations UVB ont un effet direct sur différents mécanismes tels que : la formation de dimères cyclobutyliques de pyrimidine (CPDs) et de pyrimidine (Lu *et al.* 1999; Afaq *et al.* 2005; McLoone *et al.* 2005) ; la formation de photodimères de pyrimidone (Lu *et al.* 1999) ; la photoisomérisation d'acide *trans*-urocanique en acide *cis*-urocanique (McLoone *et al.* 2005) et la génération de ROS (Figure 8) (Afaq *et al.* 2005; Nishisgori 2015).

La peau est également exposée aux radiations IR à travers de nombreuses sources autant naturelles qu'artificielles. Une étude épidémiologique récente basée sur des observations cliniques démontrent que les IR ne sont pas inoffensifs pour les cellules

humaines de la peau. Ces radiations seraient donc implicitement liées au vieillissement cutané ainsi qu'à la carcinogénèse (Schieke et al. 2003). Des recherches récentes ont caractérisé le mécanisme moléculaire de transduction cellulaire du signal ainsi que d'expression de gènes causés par ces radiations. Les IR induisent la synthèse de matrices métalloprotéinase-1 (MMP-1) via la voie de signalisation des « mitogen-activated protein kinase » (MAPKs), elle-même initiée par la génération excessive de ROS mitochondriaux (Schieke 2003; Schieke et al. 2003; Schroeder et al. 2007; Krutmann et Schroeder 2009; de Galvez et al. 2016).

Dans les deux différents cas, la production de ROS surcharge le mécanisme naturel de régulation antioxydatif, entraînant un stress oxydatif, ainsi que des dommages au sein des protéines et des macromolécules de la peau. Ces ROS sont connus pour jouer un rôle crucial dans les processus de photo-vieillesse de la peau et de la photo-carcinogénèse (Droge 2002; F'Guyer *et al.* 2003; Bowden 2004). Ces espèces chimiques peuvent modifier les protéines tissulaires en dérivés carbonylés (aldéhydes et cétones), venant par la suite s'accumuler dans le derme papillaire des tissus endommagés par les radiations (Sander *et al.* 2002).

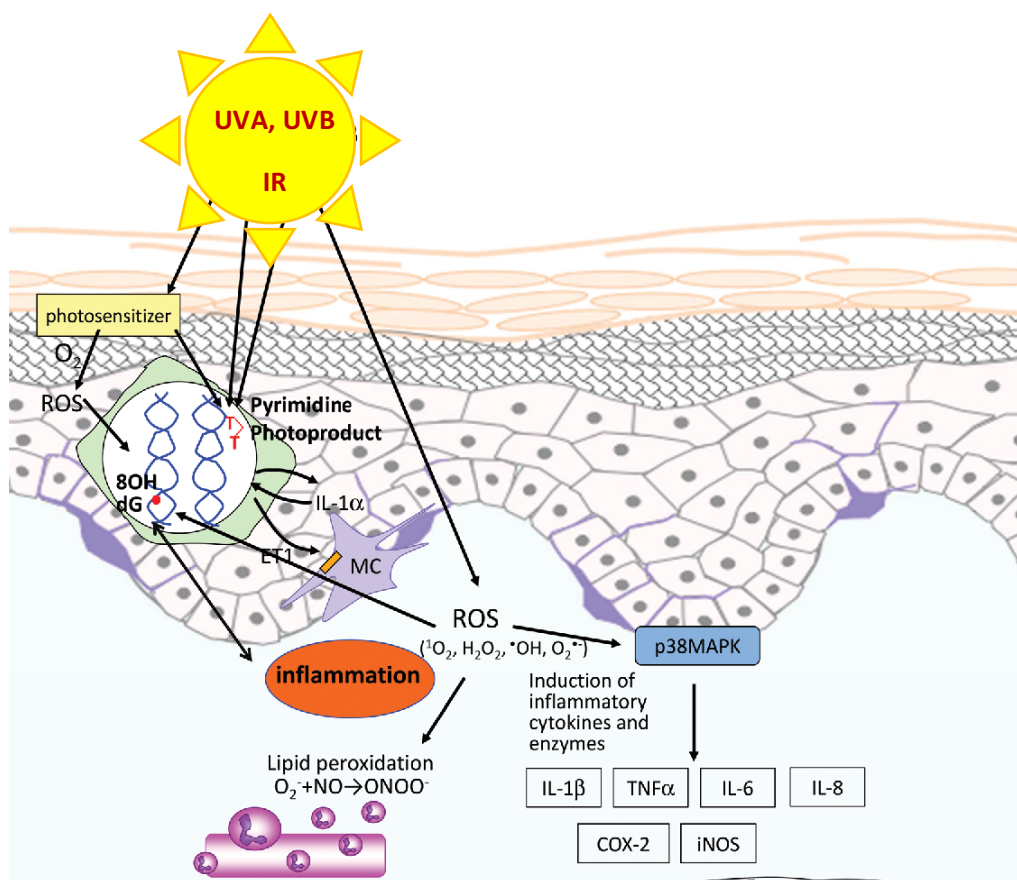


Figure 8 - Voies de signalisation induites par les irradiations solaires sur la peau

CHAPITRE 3
ARTICLE
SCIENTIFIQUE

Aralia nudicaulis L. extract protects Human Skin Fibroblasts against ROS induced by UVB and IRA radiations.

Quentin Lion¹, André Pichette, Mouadh Mihoub², Vakhtang Mshvildadze and Jean Legault^{2,*}

¹ Affiliation 1; quentin.lion1@uqac.ca

² Affiliation 2; mouadh.mihoub1@uqac.ca

* Correspondence: jean_legault@uqac.ca ; Tel.: +1 418 545-5011 (2334)

Abstract:

Human skin serves as the first protective barrier against different exposome. However, some environmental stress, such as prolonged and chronic sun exposure, can cause damages. UV and IR radiations are particularly known for being responsible for premature aging and a variety of skin diseases. Some natural products, especially plant derivatives, can strengthen the protective functions of the skin. In this study, we investigated the effects of an enriched fraction in phenolic compounds (EFPC), obtained from the rhizomes of *Aralia nudicaulis* L., on human skin cells (WS1). Our results showed that the EFPC fraction has very interesting antioxidant and anti-inflammatory properties. Furthermore, the EFPC fraction modulated ROS produced by UVB and IRA. Protection of WS1 cells against UV and IR induced ROS becomes total at 100 µg/mL of the EFPC fraction.

Keywords: *Aralia nudicaulis* L., phenolics, ROS, UVB, IRA, fibroblasts, enriched extract, quantitative analysis

3.1 Introduction

Skin ageing results from different endogenous as well as exogenous effects. Exogenous factors may include solar irradiation, air pollution, cigarette smoke, stress nutrition, lack of sleep or temperature as the skin ageing exposome (Krutmann *et al.* 2017). Despite all of their factors, solar irradiation is still the main contributor of cutaneous ageing and skin cancer. Solar spectrum is composed with ultraviolet radiation (UVR), infrared radiation (IR) and visible light.

UVR is divided into UVC (<290nm), UVB(290-315nm) and UVA (315-400nm). UVC is completely absorbed in the atmosphere, while UVA and UVB reach earth's surface and allow vitamin D synthesis (Adams *et al.* 1982). However, they are attributed to many physiologically negative effects such as inflammation and skin ageing process. The involvement of UVB in many skin

disorders including skin cancer is well established. UVB radiation could have direct effects on biomolecules; for example, the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (Lu *et al.* 1999; Afaq *et al.* 2005; McLoone *et al.* 2005), pyrimidone photodimers (Lu *et al.* 1999), photoisomerization of trans- to cis-urocanic acid (McLoone *et al.* 2005), but UVB also cause indirect generation of reactive oxygen species (ROS) (Afaq *et al.* 2005). However, the exact source of ROS produced by UVB is not clearly known. Beak *et al.* (2004) showed that NADPH oxidase and COX may play a major role in the production of ROS (Beak *et al.* 2004). Unexpectedly, Heck *et al.* found that catalase, an enzyme known for its antioxidant role, is heavily involved in the production of ROS, when keratinocytes are exposed to UVB (Heck *et al.* 2003). Human skin is also exposed to IR from several natural as well as artificial sources. Recent epidemiological data and clinical observations indicate that IR radiation cannot be considered as totally innocuous to human skin (Schroeder *et al.* 2008), particularly in photoageing⁹ induced by ROS production (Schieke *et al.* 2003). In recent studies, the molecular mechanisms involved in this process such as cellular signal transduction and gene expression have been characterised. IR radiation induces the synthesis of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) via the mitogen-activated protein kinase (MAPKs) signalling pathway initiated by an increased generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) (Schieke 2003; Schieke *et al.* 2003; Schroeder *et al.* 2007; Krutmann et Schroeder 2009; de Galvez *et al.* 2016).

It could be established that the combined effect of UV and IR radiations plays an important role in ROS generation. This increase of ROS can overload antioxidant defense mechanisms, resulting in oxidative stress and oxidative photodamage of proteins and other macromolecules (lipids or nucleic acids) in the skin. These ROS are believed to be critical mediators of the photoaging and photocarcinogenesis processes (Droge 2002; F'Guyer *et al.* 2003; Bowden 2004). ROS can modify proteins in tissue to form carbonyl derivatives, which accumulate in the papillary dermis of photodamaged skin (Sander *et al.* 2002). Botanical antioxidants have been shown to be associated with reduced incidence of ROS-mediated photocarcinogenesis and photoaging (F'Guyer *et al.* 2003; Afaq *et al.* 2005). Polyphenols, such as phenolic acid (benzoic and cinnamic acid) derivatives and flavonoids are widely distributed in plant kingdom. Their common structures with phenol functions and a conjugated double bond system makes polyphenols active antioxidants. The compounds easily become oxidized and they turn into quinones. Intermediate forms could be stabilized (Puzanowska-Tarasiewicz *et al.* 2009; Kang *et al.* 2011) free radicals from hydroxyl radicals, superoxide anion radicals or lipid radicals (Potargowicz *et al.* 2005). They can also react with different enzymes with chelation mechanisms.

Araliaceae family is popularly known with genus *Panax* and *Eleutherococcus* for their important adaptogenic and immunostimulant activities (Attele *et al.* 1999; Rege *et al.* 1999). But some species of *Aralia* genus like *Aralia elata* and *Aralia cordata* have been studied for various bioactive properties and are found in some pharmacopoeia. Anti-inflammatory and

antioxidant were two of the main activities recorded for these officinal species. The study of *Aralia nudicaulis* rhizomes brings a particular interest with a possibility to make some analogies with therapeutic species like *Aralia elata* or *Aralia cordata*.

Aralia nudicaulis L. also known as Wild sarsaparilla is an indigenous plant species in North America, which can be found abundantly from the west coast to the east coast, especially in boreal and mixed wood forests (Barrett et Helenurm 1981). The traditional use of wild sarsaparilla as an herbal medicine by the first nation people has been recorded many times. According to North American Ethnobotany Database, 79 matches were found by searching *Aralia nudicaulis* (Lacey 1993). The reported properties of *Aralia nudicaulis* include wound healing, anti-infection, blood purification and liver protection (Moerman 2009). Although *Aralia nudicaulis* is abundant in North America, only a few studies have been conducted on interesting anticancer (Wang *et al.* 2006) and anti-mycobacterial (Webster *et al.* 2010) effect from extracts of this species. Major constituents attributed to their activities in the literature, were respectively terpenes (Huang *et al.* 2006) and polyacetylenes (Li *et al.* 2012) compounds.

In this work, an enriched fraction in phenolic compounds (EFPC) was obtained from the rhizomes of *Aralia nudicaulis*, their antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties were examined. On the base of obtained results, the inhibition of ROS production induced by UVB and IR radiation on WS1 fibroblast cells were also evaluated. After the identification of the *Aralia nudicaulis* enriched extract composition, a correlation between the three major phenolic acids contents and its biological activity was established by validated method. Finally, the three major compounds were also quantified over different stages of growing period.

3.2 Results and discussion

3.2.1 Extraction yield and purification method

The methanolic extraction followed by a liquid-liquid extraction with ethyl acetate were performed on dried *Aralia nudicaulis* rhizomes. Extractions yields for methanolic and ethyl acetate extracts are respectively 7.3 and 1.1% of dried biomass. The ethyl acetate extract was purified on a HP-20 diaion column with a methanol:water gradient. The fraction obtained with the 50:50 eluant system constitute the Enriched Fraction in Phenolic Compounds (EFPC) with a 0.1% yield of dried biomass.

3.2.2 Identification and optimization of LC-MS conditions

A series of preliminary experiments were carried out in order to optimize the LC-MS conditions. Different mobile phases such as acetonitrile:water, methanol:water and acidified conditions were tested. The acidified mobile phase (0.1% formic acid) with methanol and gradient mode were necessary to achieve a satisfactory chromatographic separation in a reasonable period. Detection wavelengths were set according to the ultraviolet (UV) absorption maxima of the compounds (270 and 320 nm). In EFPC extract, three main compounds were identified as: protocatechuic acid (PA), chlorogenic acid (ChA) and caffeic acid (CA). They were characterized and validated by comparing accurate mass and their retention times with those of standard compounds (Fig. 9).

Many polyphenols were founded in *Aralia* gender, particularly flavonoids and flavonoids glycosides. But different phenolic acids have been found in *Aralia elata* and *Aralia cordata*, such as PA, ChA, CA, vanillic acid, dicaffeoylquinic acid, neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid.

PA and ChA and just ChA were quantified as major phenolic acids respectively in *Aralia cordata* (Hyun et al. 2010) and *Aralia elata* (Kim et al. 2013a).

With the same LC-MS methods and standard comparisons, 6 other minor phenolic acids were found in EFPC : 1-3- and 3-5-dicaffeoylquinic acids, 3- and 5-feruloylquinic acids, *p*-coumaric acid and vanillic acid.

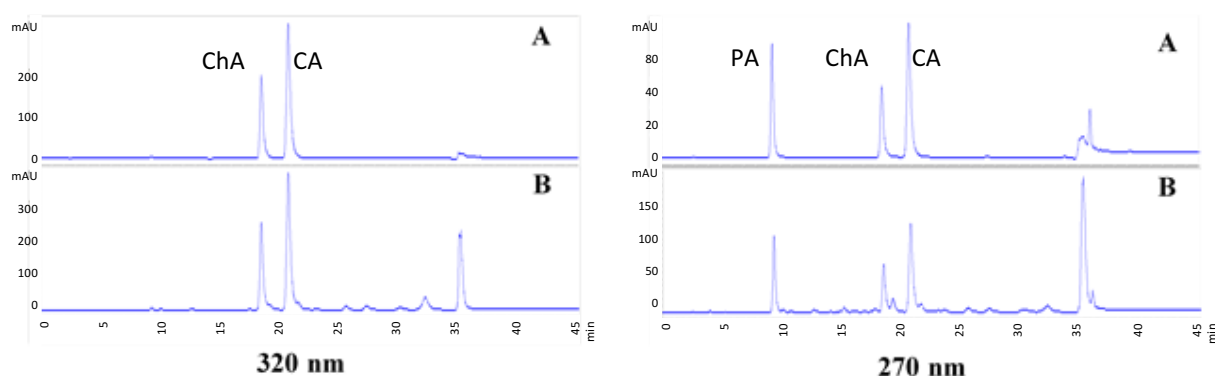


Figure 9 - (A) HPLC profiles of protocatechuic acid (PA), chlorogenic acid (ChA) and caffeic acid (CA) standards mix (B) HPLC profile of EFPC.

3.2.3 Quantitative method validation

For the standardization of *Aralia nudicaulis* extracts, the quantitative method has to be optimized and validated. After different mobile phases and gradient tests, the MeOH/Acid water binary gradient described in materials and methods was applied to proceed to the validation.

The results of calibration are summarized in Table 4, and a good correlation was found between the peak area and the concentrations ($R^2 > 0,9995$) for all standards in the range of concentration tested at their detection wavelengths. The limit of detection (LOD) is defined as the smallest peak detected while the limit of quantification (LOQ) is defined as the smallest peak quantified. In our work, detection and quantification limits were estimated by successively decreasing the concentration of the prepared standards to the smallest detectable peak. This concentration was multiplied by 3 and 10 to obtain the detection and quantification limits, respectively. As shown in Table 4, the LOD and LOQ were respectively less than 0,014 and 0,043 mg/mL, which were low enough for the determination of the analytes in the phenolic compounds enriched extract from *Aralia nudicaulis*.

Table 4 - Calibration curves, linearity, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ)

Analytes	Regression Equation	Linear Range (mg/mL)	Correlation Coefficient (R ²)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Protocatechuic Acid	$y = (13871 \pm 99.732) x - (22.992 \pm 10.331)$	0.030 – 0.500	0.999	0.01	0.029
Chlorogenic Acid	$y = (14364 \pm 103.94) x - (20.592 \pm 11.008)$	0.050 – 0.500	0.999	0.014	0.043
Caffeic Acid	$y = (26397 \pm 463.86) x - (7.5724 \pm 23.462)$	0.030 – 0.500	0.999	0.009	0.027

The repeatability and precision of the proposed method was evaluated using Relative Standard Deviation (RSD) of peak area for the three standards. These measurements of analysis repeatability are reported in Table 5 as inter-day and intra-day precision. In our work, the inter-day and intra-day tests were repeated for 3 times within 1 day or on 3 separate days. RSD values for peak area were all $\leq 2.1\%$ which were below the limit recommended by the *International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines (International Conference on Harmonization 2005)*.

Table 5 - Intra-day and Inter-day precision and accuracy results

	Intra-day (RSD, n=3) %			Inter-day (RSD, n=3) %		
	0.01 mg/mL	0.05 mg/mL	0.5 mg/mL	0.01 mg/mL	0.05 mg/mL	0.5 mg/mL
Protocatechuic Acid	0.40	0.41	0.24	0.70	0.62	0.20
Chlorogenic Acid	0.81	1.4	1.3	0.60	0.81	0.81
Caffeic Acid	0.64	1.1	2.1	0.43	1.3	0.54

3.2.4 Quantitative analysis

The standardization method was firstly performed to quantify in *Aralia nudicaulis* extracts the three major phenolic acids: Chlorogenic acid, Caffeic acid and Protocatechuic acid. As shown in Table 6, contents and percentage of these compounds were highly increased in enriched fraction with 35.65% of total composition.

PA content in all extracts was found in the range of 4.1 ± 0.6 in methanolic extract to 48 ± 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in the EFPC. The PA content quantified in EFPC, correspond to 4.8% of the total composition.

ChA and CA were found in EFPC with a three times higher concentration than Protocatechuic acid. Contents in ChA and CA were evaluated respectively to 15.6 and 15.3% in EFPC total composition. These results show an important concentration of these two phenolic acids with a respectively 2.4 and 0.28% of ChA and CA in starting methanolic extract composition.

Table 6 – Quantification of phenolic acids in the extracts from Aralia nudicaulis

	Methanolic extract ($\mu\text{g}/\text{mg}$; w/w%)	Ethyl acetate extract ($\mu\text{g}/\text{mg}$; w/w%)	EFPC ($\mu\text{g}/\text{mg}$; w/w%)
Protocatechuic Acid	4.1 ± 0.6 (0.4%)	23.0 ± 0.74 (2.3%)	48 ± 1 (4.8%)
Chlorogenic Acid	24.0 ± 0.3 (2.4%)	25 ± 2 (2.5%)	156 ± 1 (15.6%)
Caffeic Acid	2.80 ± 0.09 (0.28%)	18.0 ± 0.21 (1.8%)	153 ± 2 (15.3%)

Chlorogenic acid, caffeic acid and protocatechuic acid were also quantified over the vegetation stages in crude extracts. Concentrations were observed at three different steps of the growing period: June (flowering), August (fruit-forming) and October (preparation for wintering). All data were expressed in Fig. 10 as mean \pm standard deviation, and ANOVA (post-hoc τ -test) was performed to compare the three effects: phenolic acids, months and species, using JMP®, Version 14.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019. A p-value less than 0.05 was considered to be statistically significant (*).

As show in Figure 10, *A. nudicaulis* crude extract analyses revealed Chlorogenic acid as major compound especially at the beginning of the growing period. Content in ChA starts in June with 4.0 ± 0.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and the decrease over the next months to reach 0.96 ± 0.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in October.

Concentrations of Caffeic acid and Protocatechuic acid demonstrate similarities in their variation pattern. At the beginning and the end of vegetation period PA and CA contents were found in a range of 0.20 ± 0.03 to 0.22 ± 0.03 $\mu\text{g}/\text{mg}$. For these two phenolic acids, the lowest

concentrations were detected at the fruit-forming period with 0.05 ± 0.02 and 0.10 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively for PA and CA.

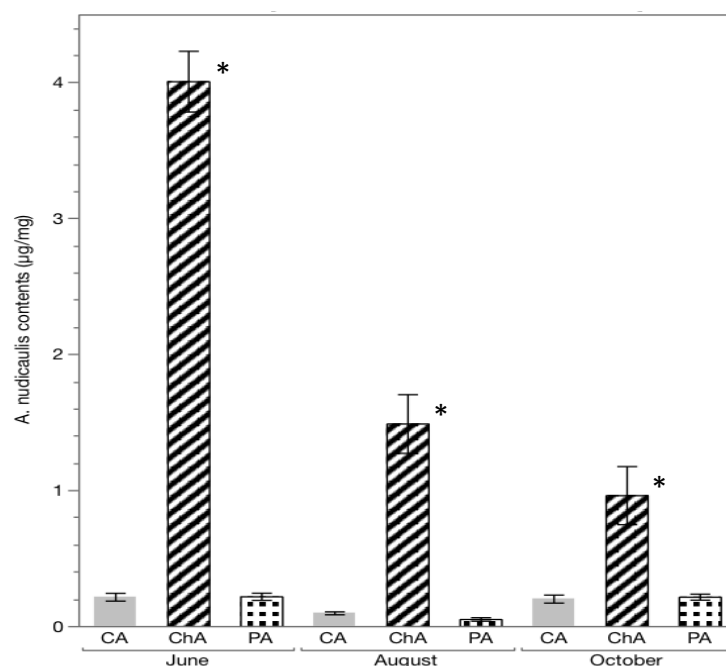


Figure 10 - Pattern of three phenolic acids (PA, ChA and CA) during the growing season for *A. nudicaulis*.

In Fig. 10., it could be observed for the variation of caffeic acid and protocatechuic acid a same pattern without any significant differences during vegetation. The significant differences (*) between the quantified compounds were the content and variation in Chlorogenic acid (Fig. 10). For this reason, the Chlorogenic acid could be proposed as chemical marker for *Aralia nudicaulis* crude extract standardization.

In *Aralia* gender, this is the first standardization suggested by quantification of phenolic compounds. Usually, terpenoid quantifications were performed to standardize *Aralia* extracts (Shikov *et al.* 2016). However, ChA have been frequently used as chemical marker for extract standardizations (de Freitas *et al.* 2016).

3.2.5 Biological activities screening

A first screening of biological activities was performed with crude extracts, EFPC, phenolic standards and a mix of standards with weight ratio based on EFPC composition.

To proceed to the following assays without any interactions, the cytotoxic activity of extracts and standards were evaluated against fibroblasts (WS-1), and results are showed in Table 7. Results with EFPC was inactive against WS-1, with IC_{50} values of 87 ± 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for resazurine test (O'Brien *et al.* 2000).

The antioxidant activity was assessed *in vitro* using ORAC assay (Ou *et al.* 2001). In Table 7, the results indicate that all tested species were strongly antioxidant with ORAC values between 11 ± 1 and 18 ± 1 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. In comparison, the ORAC value of the quercetin, used as antioxidant standard, was 23 ± 3 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. The antioxidant potential was also assessed *in vitro* using a cellular based-assay (Legault *et al.* 2003). Results for phenolic standards show IC_{50} values, for the inhibition of tBH-induced oxidation of DCFH, between 0.12 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$ and 0.13 ± 0.02 $\mu\text{g/mL}$. For EFPC and mix of standards IC_{50} values are respectively 0.31 ± 0.03 and 0.46 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$. In comparison with 0.27 ± 0.02 $\mu\text{g/mL}$ for quercetin inhibition of DCFH oxidation. These results exhibit the strong antioxidant potential of the *Aralia nudicaulis* enriched extract. These results also support the hypothesis about the contribution of the three major phenolic acids in the antioxidant activity of the EFPC.

The anti-inflammatory activity was evaluated using LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Stimulation of RAW 264.7 macrophages by LPS induces iNOS and overproduction of Nitric Oxide (NO) (Jiang et Dusting 2003). NO released from cells can be detected and quantified photometrically as its stable product, nitrite, by a simple colorimetric reaction as described in materials and methods. L-NAME, a NO synthase inhibitor, prevents the formation of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and thus was used as positive control (Paul *et al.* 1997). Two different concentrations of L-NAME were tested, 250 μM and 1 mM, with respectively $75 \pm 9\%$ and $89 \pm 10\%$ of inhibition of NO release. CA and EFPC show significant anti-inflammatory potentials with respective IC_{50} , 27 ± 14 and 35 ± 9 $\mu\text{g/mL}$. The low anti-inflammatory activities of other standards highlighted the contribution in major part of CA in EFPC activity.

The decrease of the cytotoxicity against WS-1 between the methanolic extract and EFPC could be explained by the diminution of terpenic contents (Prakash 2018) in the enriched fraction in phenolic compounds.

The increase of phenolic contents, known for their antioxidant (Miguel-Chávez 2017) and anti-inflammatory (Ambriz-Pérez *et al.* 2016) potentials, could also cause the improvement of the different tested activities showed in Table 7.

In *Aralia* genus, antioxidant potential has been already recorded, particularly in *Aralia elata* (Kim *et al.* 2013a), *Aralia continentalis* (Kim *et al.* 1998), *Aralia echinocaulis* (Lingpeng Pei 2011) and *Aralia cordata* (Hyun *et al.* 2010). Different antioxidant effects are often documented with a correlation with rich compositions in phenolic compounds.

Moreover, anti-inflammatory activity has been also recorded in *Aralia continentalis* (Han *et al.* 1983), *Aralia elata* (Lee *et al.* 2009) and *Aralia echinocaulis* (Lingpeng Pei et Jia Zhu 2011). In these *Aralia* species, anti-inflammatory activities are mainly caused by diterpenoid and triterpenoid compounds.

Table 7 - Antioxidant and anti-inflammatory activities of EFPC and phenolic standards

	Cytotoxicity IC ₅₀ (WS-1 fibroblasts) (µg /ml)	ORAC (µmol Trolox/mg)	Antioxidant IC ₅₀ (µg /ml)	Anti-inflammatory IC ₅₀ (µg /ml)
Methanolic extract	20 ± 1	0.09 ± 0.01	145 ± 48	> 160
Ethyl acetate extract	30 ± 5	5.74 ± 0.72	0.38 ± 0.04	> 160
EFPC	87 ± 6	12 ± 1	0.31 ± 0.03	35 ± 9
Protocatechuic Acid	nd	12 ± 1	0.13 ± 0.02	193 ± 58
Chlorogenic Acid	nd	11 ± 1	0.12 ± 0.01	89 ± 1
Caffeic Acid	nd	18 ± 1	0.13 ± 0.01	27 ± 14
Mix of standards	nd	12 ± 2	0.46 ± 0.03	> 160
Quercetin		23 ± 3	0.27 ± 0.02	
L-NAME 250 µM (% inhibition)				75 ± 9 %
L-NAME 1 mM (% inhibition)				89 ± 10 %

IC₅₀ is the concentration of an extract or compound where the response is a decrease by 50% of the global growth of the cell population of interest.

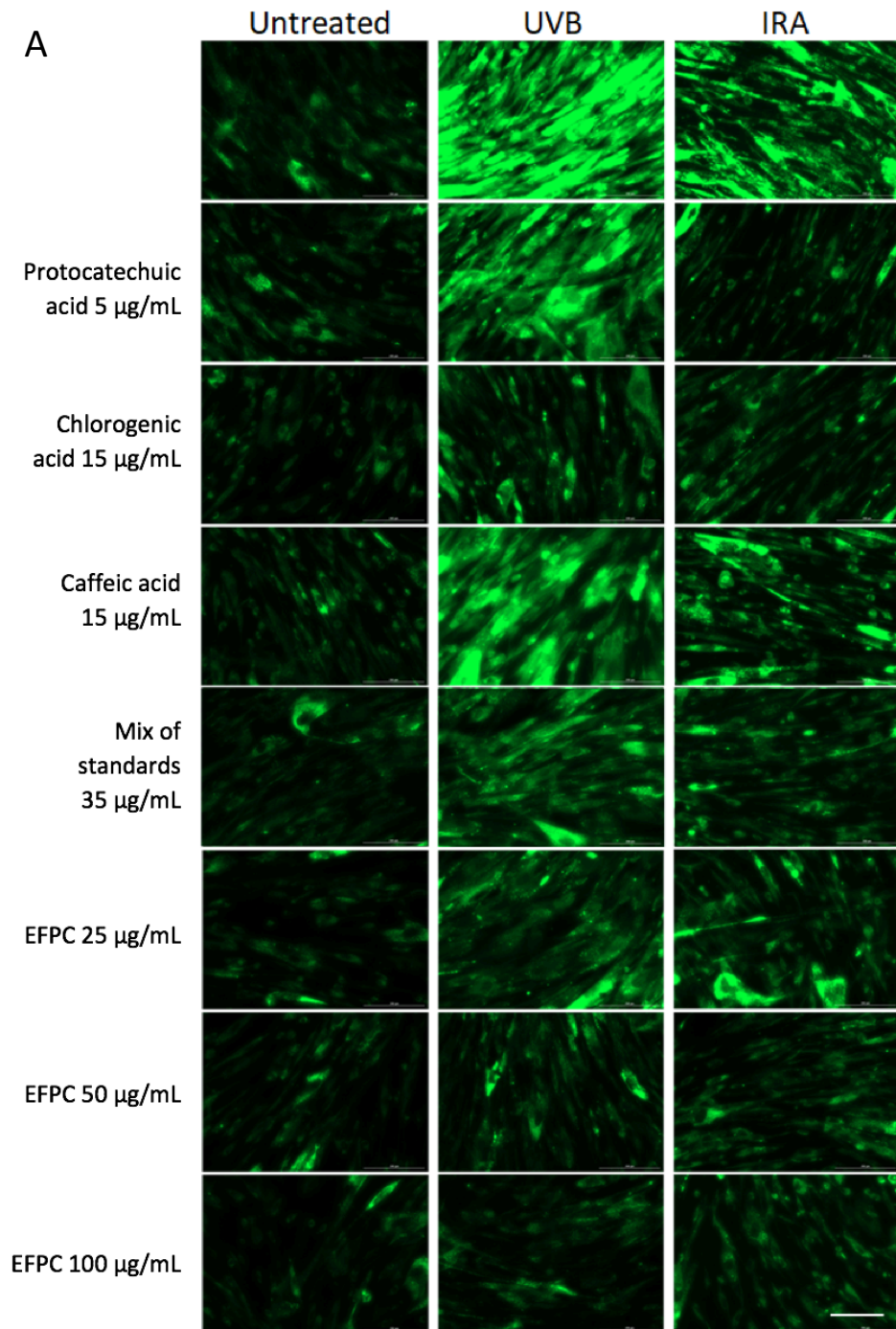
3.2.6 Evaluation of EFPC protection against UVB and IRA radiations

The effect of EFPC sample in the protection of UVB and IRA irradiated human skin fibroblasts was evaluated as described above. Dihydrorhodamine 123 (DHR123) was used as mitochondrial fluorescent probe to evaluate the mitochondrial oxidation. In presence of ROS, DHR123 was oxidized inside the cells to rhodamine 123 (RH123), and is progressively accumulated in the mitochondria. As shown in Fig. 11 (A), the green fluorescence emitted by the oxidized molecule makes it possible to evaluate ROS production that has occurred following cellular oxidations. Results show that WS1 cells are weakly fluorescent if they are not irradiated, this fluorescence corresponds to the ROS produced during normal cellular metabolism. Treatment with EFPC or chlorogenic, protocatechuic and caffeic acids does not significantly change this fluorescence. After irradiation, the oxidation rate increases dramatically, especially after UVB radiation.

The graph in Fig. 11 (B) shows that protocatechuic and chlorogenic acids are able to increase the fluorescence more than 88% cells against ROS produced by IRA, while their protection rates do not exceed 43% against UVB. The protection rate of the caffeic acid does not exceed 37% for both types of radiations. The EFPC fraction shows a protection rate that exceeds 80% and 70% for UVB and IRA induced ROS at a concentration of 50 µg/mL.

In *Aralia elata* ethanolic extract, suppressive effects on UVB-induced oxidative stress have been recorded, mainly caused by flavonoid glycosides (Yang et Kwak 2016).

Furthermore, inhibition effects on UVB-induced oxidative or inflammatory mechanisms have been measured with Chlorogenic (Cha *et al.* 2014) and Caffeic (Balupillai *et al.* 2015) acids. Not many papers have evaluated similar effects for IR-induced stresses. Nevertheless, as explained in the introduction, polyphenols are known for reducing incidence of ROS-mediated diseases.



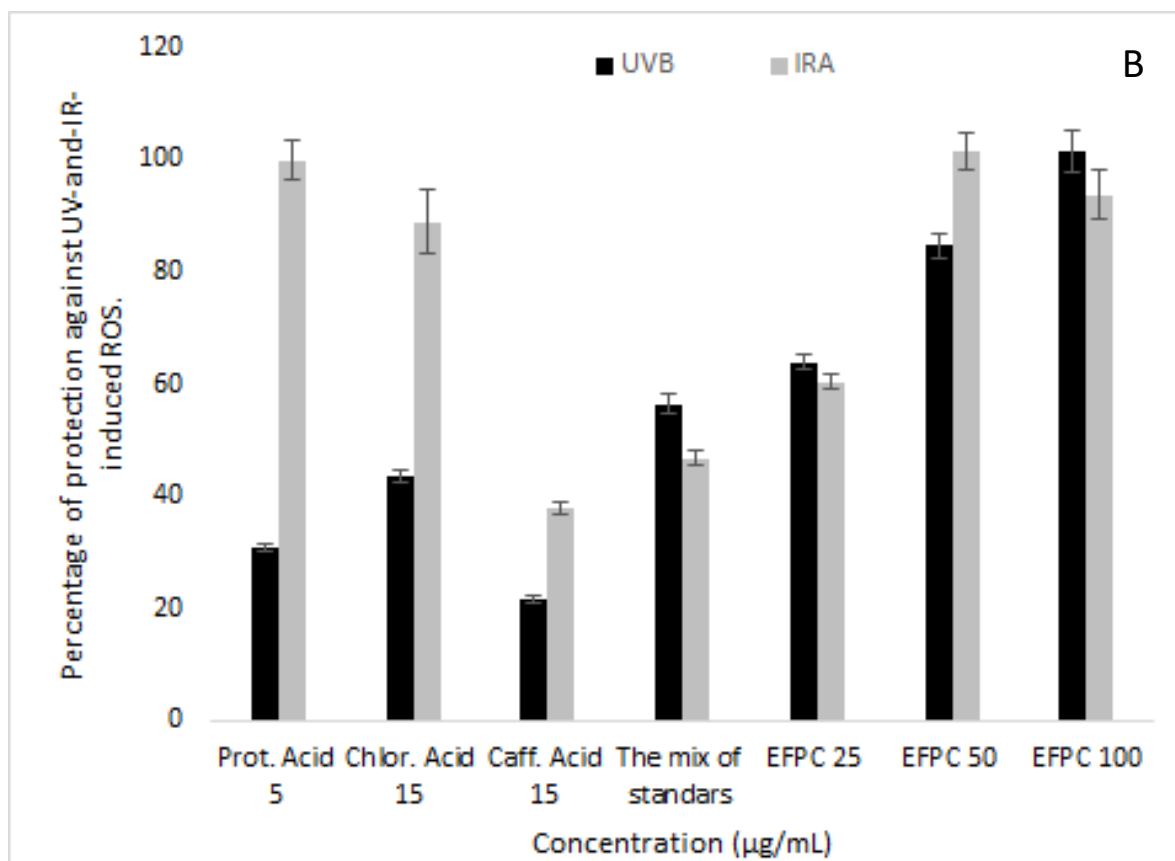


Figure 11 - Evaluation of protective effect of EFPC and positive controls (A) following UVB and IRA irradiation (4700 mJ/cm²) of human skin fibroblast (WS1). Inhibition of DHR-123 fluorescence (B) of cells treated or not with EFPC, protocatechuic acid, chlorogenic acid and caffeic acid was determined by Image J software. This analysis is representative of three independent experiments. Scale bars : 200 µM.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Crude extract and Enriched fraction in phenolic compounds:

A. nudicaulis rhizomes were collected in North of Québec (48.245498, -71.253504) at the end of the growing season. Voucher specimens (0297432 and 0297433) were deposited at the Louis-Marie Herbarium, Laval University (Québec, Canada). Plant material was extracted firstly with hexane to remove some lipophilic compounds, followed with three times extraction with MeOH under reflux heating for 1.5 hours. Obtained dry methanolic extract was dissolved in water and treated with AcOEt. Organic phase, enriched in phenolic compounds was subjected to a liquid phase chromatography on HP-20 diaion column and eluted with MeOH : H₂O in gradient conditions (0% MeOH to 100%MeOH). All the chemical and biological tests were

performed on the fraction obtained by MeOH 50%, that have shown the richest phenolic composition (EFPC).

For sample solutions, 40.0 mg of the phenolic compounds enriched fraction from *Aralia nudicaulis* roots was introduced in a 10 mL volumetric flask and solubilised in HPLC-MeOH. Three solutions were subsequently prepared by dilution (1.0; 2.0 and 4.0 mg/mL). Then 2 ml of each solution were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, ref HVPL04700) before HPLC analysis.

3.3.2 Standardized extract and standards preparation:

A. nudicaulis rhizomes were collected at the same mention place. Sampling was achieved three times during the growing season: June, August and October. Immediately, rhizomes were frozen in liquid nitrogen, lyophilized and powdered.

0,5g of rhizomes powder sonicated in 10mL 70% aqueous methanol for 15 minutes with a Fisher Scientific FS220D 40kHz, according to the method of Tian et al. (2005) (Tian *et al.* 2005). After a centrifugation at 4000 rpm for 10 minutes, the supernatant was removed and the extraction was repeated twice more with the same method. Supernatants of same sample were combined and evaporated. Obtained crude extract was resuspended into a 2mL volumetric flask with MeOH and filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, ref HVPL04700) before HPLC analysis.

Stock solutions of 1 mg/mL of phenolic acid standards were prepared by dissolving the appropriate amount of each in a 10mL volumetric flask with MeOH. All solutions were kept at -15 °C. The working standard solutions were subsequently prepared by dilution (in the concentration range of 0.01-0.5 µg/mL with n=6). All prepared standard solutions were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, ref HVPL04700) before HPLC analysis.

3.3.3 Chromatographic instrumentation and conditions:

The LC-MS system from Agilent Technologies LC series 1100 equipped with a quaternary gradient pump, a vacuum degasser, a thermostated column compartment, an auto-sampler and a photodiode array detection system (DAD) and MS. Chromatograms were recorded and evaluated by the Agilent Chemstation software. The reverse-phase chromatography was performed with an analytical Kinetex C18 column (250 x 4.6 mm; 5 µm particle size), thermostated at 25°C for the separation. The MS setting was in negative mode with an Electro Spray (ES) and APCI ionization. All solvents used during this study, were HPLC grade solvents.

The optimized method used a binary-gradient mobile phase with water containing 0.1% formic acid as mobile phase A and MeOH as mobile phase B.

The separation was performed in a gradient elution with the following proportions (v/v) of solvent B: 0-10min, 12-16%; 10-11min, 16-20%; 11-31min, 20-24%; 31-32min, 24-100%; and 32-37min, 100%, at the flow rate of 1,0 ml/min, and the injection volume of 5 µl.

Detection and quantification was carried out at 270 nm for Protocatechuic acid; and at 320 nm for Chlorogenic and Caffeic acid.

3.3.4 HPLC method validation:

The method was validated with standards in terms of linearity, intra-day and inter-day precision and accuracy. The linearity of the HPLC method was performed with six different concentrations of standards prepared and analyzed in triplicate for each concentration in the 0.01 to 0.5 mg/mL range. Calibration curves were constructed by plotted peak areas (U.A) against concentrations (mg/mL). The linearity was assessed by calculating the slope, y-intercept and coefficient of correlation (r^2) using least squares regression. The calculations for the limits of detection (LOD) were based on the standard deviation of y-intercepts of the regression lines (σ) and the slope (S), using the following equation $LOD = 3.3 \sigma/S$. Limits of quantitation (LOQ) were calculated by the equation $LOQ = 10 \sigma/S$.

The precision of the method was evaluated with respect to both intra-day and inter-day precision. Three replicates of each level of phenolic acid standards were assayed in one run for the intraday experiment. Three replicates of each level of phenolic acid standards were assayed within three different days for the inter-day experiment. The intra-day and inter-day precision and accuracy of the assay were determined by Relative standard deviation (RSD).

The accuracy of the method was evaluated using the recovery test. At each level, samples were analyzed in triplicates according to the previously described chromatographic conditions.

3.3.5 Measurement of different biological activities

3.3.5.1 ORAC_{FL} assay

The procedure was modified from the method described by Ou et al. (2001) (Ou *et al.* 2001). Briefly, the ORAC assay was carried out on a Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems). Trolox was used as a control standard. The experiment was conducted at 37.5 °C and pH 7.4, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every 1 min after addition of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). The final results were calculated by comparing the net areas under

the fluorescein decay curves between the blank and the samples. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ($\mu\text{mol TE/mg}$).

3.3.5.2 Antioxidant cell assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)

Antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by Girard-Lalancette et al. (2009) (Girard-Lalancette *et al.* 2009), with some modifications. Briefly, WS1 cells were plated in 96 microwell plates at 10,000 cells per well and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were washed with 150 μl Hank's balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4 and incubated for 30 min with 100 μl HBSS (pH 7.4) containing 5 μM DCFH-DA (Sigma–Aldrich). The cells were then washed again with 150 μl HBSS. To assess antioxidant activity, the cells were incubated either with a growing concentration of enriched fraction from *Aralia nudicaulis*, trolox or quercetin, in the absence or presence of 200 μM tert-butylhydroperoxide (tBH). Fluorescence was measured after 1 h and 4 h on the automated plate reader (Fluoroskan Ascent FL™, Labsystems) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

3.3.5.3 Measurement of anti-inflammatory activity by nitrite quantification

Exponentially growing RAW 264.7 (murine macrophages) were plated in 96-well microplates (BD Falcon) at a density of 7.5×10^4 cells per well in 100 μl of culture medium (DMEM) and were allowed to adhere overnight. Cells were then treated with or without positive control N(w)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, $\geq 98\%$, Sigma–Aldrich), or increasing concentrations of extracts dissolved in DMSO, the final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cells were then stimulated with 100 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS) and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. After 24 h, cell-free supernatants were collected and immediately determined using the Griess reaction (Adams *et al.* 1990) with minor modifications. Briefly, 100 μl aliquots of cell supernatants were incubated with 50 μl of 1% sulphanilamide and 50 μl of 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄ at room temperature for 20 min. Absorbance at 540 nm was then measured using an automated Varioskan Ascent plate reader (Thermo Electron) and the presence of nitrite was quantified by comparison with an NaNO₂ standard curve.

3.3.5.4 Evaluation of cytotoxicity against WS1 cell lines

Exponentially growing WS1 cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 μL of culture medium (DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, vitamins 1X, penicillin and streptomycin) and were allowed to adhere for 16 h before treatment. A concentration gradient of each compound was prepared in biotech DMSO (Sigma–Aldrich) and then diluted in DMEM before it was added to

microplates (100 μ L per well). Cells were then incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. As described by O'Brien et al. (2000) (O'Brien *et al.* 2000), cytotoxicity was assessed using resazurin on an automated Fluoroskan Ascent FLTM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values.

3.3.5.5 UVB and IRA stress protection assay

WS1 human skin fibroblast cells were plated in transparent flat bottom 96-well microplates (Greiner, μ Clear[®]) at 14 000 cells per well and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were treated (or untreated) during 20 min with 50 μ L of EFPC sample at 100, 50 and 25 μ g/ml or positive controls namely, protocatechuic acid, chlorogenic acid and caffeic acid at 5, 15 and 15 μ g/ml respectively. Cells were then exposed 4700 mJ/cm² UVB and incubated for 15 minutes. 50 μ L of DHR-123 (1 μ g/ml) was added to estimate ROS formed following radiations. After 5 min of incubation, cells were washed with PBS and observed on a cell imaging multimode reader (Citation 3) using excitation and emission wavelength of 507 and 529 nm respectively. The same approach was followed for irradiation with IRA, which was carried out under an infrared water-filtered lamp. The energy received by the cells has been estimated at 5300 mJ/cm². Green fluorescence was quantified with ImageJ software. Each experiment was carried out in triplicate and the results are representative of at least three different experiments. Statistical analysis was carried out by the Kruskal-Wallis One Way Test followed by post-hoc Student-Newman-Keuls' test using SigmaStat 3.5 software. $P \leq 0.05$ was considered as significantly different.

3.4 Conclusion

The antioxidant potential is a common property of natural extracts composed with phenolic compounds. Our results show antioxidant potential from *Aralia nudicaulis* rhizomes extract enriched in phenolic compounds. This is the first report about inhibition of ROS generation induced by UVB and IRA. These protective effects are greater than those of the active molecules present in the EFPC fraction (protocatechuic acid, chlorogenic acid and caffeic) and tested from commercial products, at the same proportions. To highlight the correlation between composition and biological activities, the three major phenolic acids (PA, ChA and CA) were quantified by a validated method. These quantitative analyses performed over the growing period, revealed Chlorogenic acid as a good chemical marker for the standardization of *Aralia nudicaulis* extracts. Our results may support and supplement the use of *A. nudicaulis* in the fields of food and medicine to prevent human photoaging diseases.

References

1. Krutmann, J.; Bouloc, A.; Sore, G.; Bernard, B. A.; Passeron, T., The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science* **2017**, *85* (3), 152-161.
2. Adams, J. S.; Clemens, T. L.; Parrish, J. A.; Holick, M. F., Vitamin-D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin-D-deficient subjects. *New England Journal of Medicine* **1982**, *306* (12), 722-725.
3. Lu, Y.-P.; Lou, Y.-R.; Yen, P.; Mitchell, D.; Huang, M.-T.; Conney, A. H., Time Course for Early Adaptive Responses to Ultraviolet B Light in the Epidermis of SKH-1 Mice. *Cancer Research* **1999**, *59* (18), 4591.
4. McLoone, P.; Simics, E.; Barton, A.; Norval, M.; Gibbs, N. K., An Action Spectrum for the Production of cis-Urocanic Acid in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **2005**, *124* (5), 1071-1074.
5. Afaq, F.; Adhami, V. M.; Mukhtar, H., Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2005**, *571* (1), 153-173.
6. Beak, S. M.; Lee, Y. S.; Kim, J.-A., NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie* **2004**, *86* (7), 425-429.
7. Heck, D. E.; Vetrano, A. M.; Mariano, T. M.; Laskin, J. D., UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (25), 22432-22436.
8. Schroeder, P.; Haendeler, J.; Krutmann, J., The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Experimental gerontology* **2008**, *43* (7), 629-632.
9. Schieke, S. M.; Schroeder, P.; Krutmann, J., Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2003**, *19* (5), 228-34.
10. Schieke, S. M., [Photoaging and infrared radiation. Novel aspects of molecular mechanisms]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **2003**, *54* (9), 822-4.
11. de Galvez, M. V.; Aguilera, J.; Sanchez-Roldan, C.; Herrera-Ceballos, E., Infrared radiation increases skin damage induced by other wavelengths in solar urticaria. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2016**, *32* (5-6), 284-290.
12. Krutmann, J.; Schroeder, P., Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* **2009**, *14* (1), 44-9.
13. Schroeder, P.; Pohl, C.; Calles, C.; Marks, C.; Wild, S.; Krutmann, J., Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free radical biology & medicine* **2007**, *43* (1), 128-35.
14. Bowden, G. T., Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nature reviews. Cancer* **2004**, *4* (1), 23-35.
15. F'Guyer, S.; Afaq, F.; Mukhtar, H., Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2003**, *19* (2), 56-72.
16. Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **2002**, *82* (1), 47-95.

17. Sander, C. S.; Chang, H.; Salzmänn, S.; Müller, C. S.; Ekanayake-Mudiyanselage, S.; Elsner, P.; Thiele, J. J., Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *The Journal of investigative dermatology* **2002**, *118* (4), 618-25.
18. Kang, N. J.; Shin, S. H.; Lee, H. J.; Lee, K. W., Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics* **2011**, *130* (3), 310-24.
19. Puzanowska-Tarasiewicz, H.; Kuźmicka, L.; Tarasiewicz, M., Organism defense against reactive oxygen species. *Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)* **2009**, *62* (4), 248-256.
20. Potargowicz, E.; Szerszenowicz, E.; Staniszevska, M.; Nowak, D., [Mitochondria as an source of reactive oxygen species]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* **2005**, *59*, 259-66.
21. Attele, A. S.; Wu, J. A.; Yuan, C. S., Ginseng pharmacology - Multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58* (11), 1685-1693.
22. Rege, N. N.; Thatte, U. M.; Dahanukar, S. A., Adaptogenic properties of six Rasayana herbs used in ayurvedic medicine. *Phytother. Res.* **1999**, *13* (4), 275-291.
23. Ministry of health labor and welfare, THE JAPANESE PHARMACOPOEIA. 17ème ed.; **2016**
24. Shikov, A. N.; Pozharitskaya, O. N.; Makarov, V. G.; Wagner, H.; Verpoorte, R.; Heinrich, M., Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *154* (3), 481-536.
25. Barrett, S. C. H.; Helenurm, K., FLORAL SEX RATIOS AND LIFE HISTORY IN ARALIA NUDICAULIS (ARALIACEAE). *Evolution; international journal of organic evolution* **1981**, *35* (4), 752-762.
26. Lacey, L., *Micmac medicines remedies and recollections*. Halifax, N.S. : Nimbus Pub.: Halifax, N.S., 1993; p 125.
27. Moerman, D. E., *Native American medicinal plants : an ethnobotanical dictionary*. Portland, Or. : Timber Press: Portland, Or., 2009; p 799 p.
28. Wang, J.; Li, Q.; Ivanochko, G.; Huang, Y., Anticancer effect of extracts from a North American medicinal plant-- wild sarsaparilla. *Anticancer research* **2006**, *26* (3A), 2157.
29. Webster, D.; Lee, T. D. G.; Moore, J.; Manning, T.; Kunitomo, D.; LeBlanc, D.; Johnson, J. A.; Gray, C. A., Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Canadian Journal of Microbiology* **2010**, *56* (6), 487-494.
30. Li, H. X.; O'Neill, T.; Webster, D.; Johnson, J. A.; Gray, C. A., Anti-mycobacterial diynes from the Canadian medicinal plant *Aralia nudicaulis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, *140* (1), 141-144.
31. Huang, Y. G.; Li, Q. Z.; Ivanochko, G.; Wang, R., Novel selective cytotoxicity of wild sarsaparilla rhizome extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2006**, *58* (10), 1399-1403.
32. Hyun, S.; Jung, H. A.; Min, B. S.; Jung, J. H.; Choi, J., *Isolation of phenolics, nucleosides, saccharides and an alkaloid from the root of Aralia cordata*. 2010; Vol. 16, p 20-25.
33. Kim, M.; Kim, J.; Yoon, K., Effects of blanching on antioxidant activity and total phenolic content according to type of medicinal plants. *Food Sci Biotechnol* **2013**, *22* (3), 817-823.
34. International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **2005**.

35. Shikov, A. N.; Pozharitskaya, O. N.; Makarov, V. G., *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J.Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2016**, 23 (12), 1409-1421.
36. de Freitas, M. M.; Fontes, P. R.; Souza, P. M.; Fagg, C. W.; Guerra, E. N. S.; de Medeiros Nóbrega, Y. K.; Silveira, D.; Fonseca-Bazzo, Y.; Simeoni, L. A.; Homem-de-Mello, M., Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PloS one* **2016**, 11 (9), e0163130.
37. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry* **2000**, 267 (17), 5421-6.
38. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49 (10), 4619-4626.
39. Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J.-C., Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta medica* **2003**, 69 (05), 402-407.
40. Jiang, F.; Disting, G. J., Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current vascular pharmacology* **2003**, 1 (2), 135-156.
41. Paul, A.; Bryant, C.; Lawson, M. F.; Chilvers, E. R.; Plevin, R., Dissociation of lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide synthase and inhibition of DNA synthesis in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* **1997**, 120 (8), 1439-1444.
42. Prakash, V., Terpenoids as cytotoxic compounds: A perspective. *Pharmacognosy Reviews* **2018**, 12 (24), 166-176.
43. Miguel-Chávez, R., Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. 2017.
44. Ambriz-Pérez, D. L.; Leyva-López, N.; Gutierrez-Grijalva, E. P.; Heredia, J. B., Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture* **2016**, 2 (1), 1131412.
45. Kim, J.-S.; Kang, S.-S.; Park, J.-S., Antioxident components from *Aralia continentalis*. *Proceedings of the Korean Society of Applied Pharmacology* **1998**, 182-182.
46. Lingpeng Pei, Effect of *Aralia Echinocaulis* Hand. Mazz Flavonoids on Osteoporosis Induced by Prednisone in Rats. *Shizhen Guoyi Guoyao* **2011**, 22.
47. Han, B. H.; Han, Y. N.; Han, K. A.; Park, M. H.; Lee, E. O., Studies on the anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* (I). *Archives of Pharmacal Research* **1983**, 6 (1), 17.
48. Lee, J.; Ha, Y.; Jeong, C.; Kim, Y.; Park, Y., Isolation and tandem mass fragmentations of an anti-inflammatory compound from *Aralia elata*. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, 32 (6), 831-840.
49. Lingpeng Pei; Jia Zhu, Effect of *Aralia Echinocaulis* Hand. Mazz Flavonoids on the Differentiation of Osteoclast. *Zhongguo Laonianxue Zazhi* **2011**, (31).
50. Kwak, C. S.; Yang, J., Suppressive effects of ethanol extract of *Aralia elata* on UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes. *J Nutr Health* **2016**, 49 (3), 135-143.
51. Yang, J.; Kwak, C., Inhibitory effect of *Aralia elata* ethanol extract against skin damage in UVB-exposed human keratinocytes and human dermal fibroblasts. *J Nutr Health* **2016**, 49 (6), 429-436.

52. Cha, J. W.; Piao, M. J.; Kim, K. C.; Yao, C. W.; Zheng, J.; Kim, S. M.; Hyun, C. L.; Ahn, Y. S.; Hyun, J. W., The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomol Ther (Seoul)* **2014**, 22 (2), 136-142.
53. Balupillai, A.; Prasad, R. N.; Ramasamy, K.; Muthusamy, G.; Shanmugham, M.; Govindasamy, K.; Gunaseelan, S., Caffeic acid inhibits UVB-induced inflammation and photocarcinogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ctivated recepto*Photochemistry and photobiology* **2015**, 91 (6), 1458-1468.
54. Tian, S.; Nakamura, K.; Cui, T.; Kayahara, H., *High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice*. 2005; Vol. 1063, p 121-8.
55. Girard-Lalancette, K.; Pichette, A.; Legault, J., Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry* **2009**, 115 (2), 720-726.
56. Adams, L. B.; Hibbs, J. B., Jr.; Taintor, R. R.; Krahenbuhl, J. L., Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **1990**, 144 (7), 2725-9.

CHAPITRE 4

RÉSUMÉ DÉTAILLÉ

DES TRAVAUX

COMPLÉMENTAIRES

4.0 Préambule

Ce chapitre se veut un résumé détaillé des travaux effectués tout au long de ce projet de maîtrise et qui ne sont pas présentés dans la publication du chapitre 3.

Ce projet à débuter par l'échantillonnage ainsi que divers procédés d'extraction des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* afin de permettre un criblage phytochimique préliminaire. Ces méthodes d'échantillonnages ainsi que les divers protocoles d'extraction sont présentés dans le sous-chapitre 4.1. De plus, ce sous-chapitre présente le suivi de l'activité biologiques effectué sur les différents extraits, permettant ainsi d'orienter les travaux pour la suite de l'étude. Suite à cette étude phytochimique et de l'évolution de certaines activités biologiques, le projet s'est divisé en deux axes majeurs. Le premier volet porte sur l'étude d'extraits enrichis en saponines triterpéniques et l'autre sur l'étude d'extraits enrichis en composés phénoliques.

Dans un premier temps, le sous-chapitre 4.2 traite donc des protocoles permettant l'isolation et la purification de diverses saponines triterpéniques. Également, les approches et les résultats d'élucidation structurale partielle par RMN sont décrites dans ce sous-chapitre.

Le sous-chapitre 4.3 présente, le fractionnement ainsi que les méthodes et résultats d'identification par HPLC-MS de composés minoritaires dans les fractions enrichies en composés phénoliques. Enfin, les résultats pour ces fractions phénoliques, aux différents tests d'inhibition enzymatique et d'immunofluorescence indirecte y seront également présentés.

SOUS-CHAPITRE 4.1

ÉCHANTILLONAGE ET CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE PRÉLIMINAIRE

4.1.1 Échantillonnage

Les spécimens d'*Aralia nudicaulis* L. ont été récoltés durant l'été 2016 dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, en bordure de forêt du secteur du lac Simoncouche, près de Laterrière (QUÉBEC) (Latitude : 48.2307 ; Longitude : -71.2507). Les rhizomes ont été séchés à température ambiante dans un endroit sombre durant plusieurs semaines avant d'être broyées dans un broyeur mécanique.

Pour les travaux portant sur le dosage de composés d'intérêts au sein des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* au cours de la période de végétation ainsi que pour la standardisation d'extraits, l'échantillonnage a été réalisé de manière plus stricte selon les conditions suivantes. Les rhizomes de six spécimens d'*Aralia nudicaulis* ont été récoltés dans un quadrat mis en place dans le secteur énoncé précédemment. Les récoltes ont été répétées aux trois différents stades de la période de végétation suivants : floraison (Mai), fructification (Août), préparation pour l'hiver (Octobre). Les rhizomes ont été plongés dans l'azote liquide dès leur récolte pour stopper toute activité cellulaire et ensuite placés au lyophilisateur durant une semaine. Par la suite, des tronçons de 1 cm ont été réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à bille à 30 battements par seconde durant 2 minutes. Les échantillons ont toujours été conservés à -15°C.

4.1.2 Extraction et fractionnement

4.1.2.1 Extraction solide/liquide par chauffage à reflux

L'extraction a été effectuée sur 764 g de rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L. par reflux à l'aide de trois solvants successifs : l'hexane, le méthanol (MeOH), et un mélange méthanol/eau en proportions 30:70 (v/v). Chaque extraction a nécessité un volume de 3L de solvant, pour une durée d'extraction de 1h30, et a été réitérée trois fois pour chacun des solvants. L'utilisation en premier lieu d'un solvant apolaire tel que l'hexane, permet un « dégraissage », enlevant ainsi préalablement la majeure partie des cires, des glycérides et des acides gras de l'extrait souhaité.

4.1.2.2 Extraction liquide/liquide

Après estimation de la composition par chromatographie sur couche mince (CCM), l'extrait méthanolique des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L. a été soumis à des extractions liquide/liquide successives. Une masse de 69 g d'extrait méthanolique a été dissoute dans 500 mL d'eau et extraite dans un premier temps six fois avec 500 mL d'acétate d'éthyle (AcOEt), puis dans un second temps, cinq fois avec 500 mL de butanol saturé (BuOH). Au préalable, un mélange BuOH/eau en proportions 3:2 (v/v) a été préparé pour saturer le BuOH en eau avant d'être laissé à décanter durant une nuit. L'extraction à l'aide d'AcOEt et BuOH permet une première séparation de l'extrait MeOH par la différence de polarité de ces deux solvants. L'ensemble des rendements des extraits bruts et liq/liq sont décrits ci-après (Figure 12).

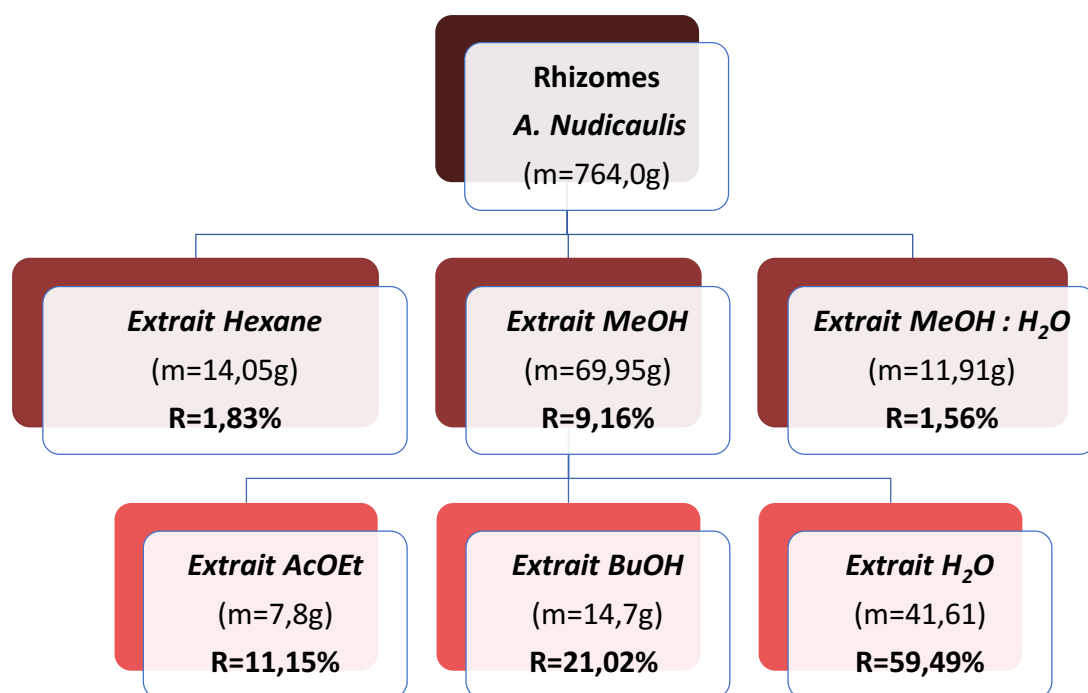


Figure 12 - Schéma et rendements d'extractions et de fractionnement des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L.

4.1.2.3 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Tout au long du projet, des suivis par CCM ont été effectués afin d'estimer rapidement la composition d'un extrait ou d'une fraction. Celles-ci ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'une couche de 200 μm soit de silice, soit de silice greffée C18 possédant un indicateur UV à $\lambda=254\text{ nm}$. Divers milieux d'élution ont été mis à l'essai afin d'identifier les conditions d'analyses optimales. Dans la majeure partie des cas, un mélange $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ en proportion 26:14:3 (v/v/v) a été utilisé.

Les plaques ont été révélées à l'aide de deux révélateurs différents selon la famille de molécules suspectée. Pour les saponines triterpéniques, une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 20% dans du méthanol a été pulvérisée sur celles-ci pour obtenir des taches de couleur rougeâtre spécifique. Concernant les composés de nature phénolique, une application successive d'une solution de 2-aminoethyl diphenylborinate dissout à 1% dans du méthanol (NP), et de polyéthylèneglycol dissout à 5% dans de l'éthanol (PEG) a été nécessaire. Après révélation, les plaques ont été placées à l'étuve à 100°C pendant 3 à 5 minutes, suite à cela, les plaques ont été observées sous une lampe UV à 365 nm. Des taches colorées spécifiques apparaissent généralement bleues pour les acides phénoliques et jaune-orange pour les flavonoïdes. Les CCM des différentes fractions seront présentées au fur et à mesure du chapitre, en décrivant les milieux d'élution et les révélateurs utilisés.

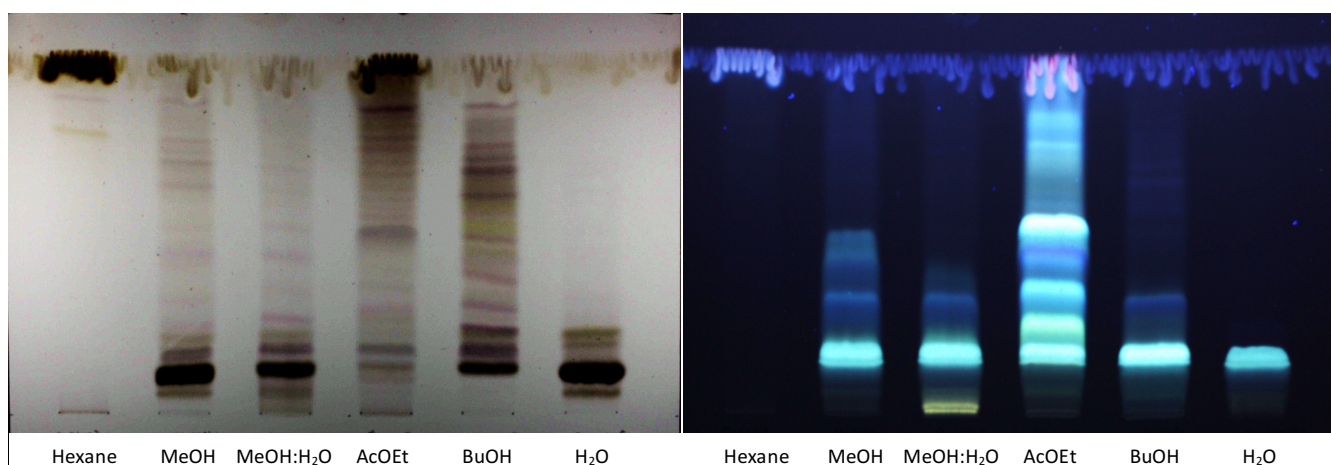


Figure 13 - CCM récapitulative d'extractions successives des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L. – $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (26:14:3) – H_2SO_4 (gauche) et NP-PEG à 365nm (droite)

4.1.3 Bioguidage de l'étude phytochimique

Durant l'intégralité du projet, un suivi des différentes activités biologiques a été effectué afin de guider la poursuite des différents travaux. Les tests effectués visaient à évaluer les activités suivantes : activité cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire des extraits, des fractions et des composés. Tous les échantillons ont été solubilisés dans du DMSO, en maintenant une concentration en plaque inférieure à 0,5% de ce dernier, afin d'éviter une toxicité liée au solvant.

4.1.3.1 Activité cytotoxique sur des lignées saines et cancéreuses

Les tests cytotoxiques ont été effectués sur deux lignées de cellules cancéreuses (de poumons A549, et colorectales DLD-1), ainsi que sur une lignée de cellules fibroblastes saines (WS-1) afin d'évaluer la sélectivité des échantillons. Selon le principe de ce test (O'Brien *et al.* 2000), les échantillons sont d'abord solubilisés à différentes concentrations, puis incubés avec 5000 cellules de chaque lignée pendant 48 heures sous atmosphère humidifiée. Le test s'effectue en deux étapes successives. La première est la mesure de l'activité métabolique par réduction de la résazurine. Ce composé est réduit en résorufine, un fluorochrome dont la fluorescence est mesurée et témoigne ainsi de la viabilité des cellules. La mesure se fait à l'aide d'un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLTM en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 530 nm et une longueur d'onde d'émission à 590 nm. Cependant, un ralentissement métabolique ne traduit pas nécessairement une certaine toxicité pour les cellules cancéreuses. C'est pourquoi un deuxième volet de test est effectué, consistant en un dosage de la mortalité des cellules après retrait des surnageants. Les cellules saines au fond des puits sont lysées au sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0,01%, afin d'en libérer le contenu. Le réactif de Hoechst interagit alors avec les brins d'ADN pour créer un complexe fluorescent, qui a été à nouveau quantifié. La mesure est effectuée par un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLTM, en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 355 nm et une longueur d'onde d'émission à 460 nm. Les différentes concentrations des échantillons ont permis d'évaluer leur impact, ainsi que la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la croissance cellulaire

(IC₅₀). En guise de témoin, chaque analyse a été lancée parallèlement à l'étoposide, un anticancéreux connu.

4.1.3.2 Activités antioxydantes cellulaire et chimique

L'activité antioxydante est évaluée selon deux types de tests : un test cellulaire et un test ORAC. Les modes opératoires sont décrits dans l'article de K. Lalancette (Girard-Lalancette *et al.* 2009) avec quelques modifications.

Le test antioxydant sur cellule mesure la capacité antioxydante d'une substance sur des cellules fibroblastes saines (WS-1). Pour cela, des plaques de 96 puits comprenant 10 000 cellules par puits sontensemencées et incubées à 37 °C en présence de 5% de CO₂ sous atmosphère humidifiée. Après 24 heures, les cellules sont lavées avec 150 µL d'une solution tampon de phosphate salin (PBS) à un pH de 7,4, puis remises à incuber durant 30 minutes avec une solution saline isotonique (Hank's Balanced Salt Solution HBSS) contenant 5 µM de 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). Ce dernier composé est un fluorochrome permettant de déterminer l'oxydation intra-cellulaire. Les cellules sont ensuite à nouveau lavées avec 150 µL de PBS. Pour obtenir l'activité antioxydante, elles sont ensuite incubées pendant 1 heure avec des concentrations croissantes des composés testés en absence ou en présence de 200 µM de tert-butylhydroperoxide (t-BuOOH). La fluorescence des puits est alors mesurée immédiatement après l'ajout du t-BuOOH, et à nouveau après 90 minutes par un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLTM, dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 485 nm et 538 nm. Les résultats sont exprimés en IC₅₀, et comparés à trois témoins positifs : la quercétine, le trolox et la catéchine.

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), détermine quant à lui la capacité des composés à neutraliser les radicaux peroxydes de la fluorescéine, une sonde fluorescente désactivée après oxydation. Un gradient de 16 concentrations d'échantillons est préparé sans réplifications. Les expériences se déroulent à 37,5 °C dans une solution de tampon phosphate 75 mM à pH 7,4, avec un blanc en parallèle. La fluorescence est mesurée par un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLTM toutes les minutes après l'ajout d'une solution oxydante à 375 µM, le 2,2'-azobis(2-méthylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH). L'appareil est réglé

avec les mêmes conditions d'utilisation que pour le test antioxydant cellulaire. La cinétique dure au total 60 minutes, puis les résultats sont calculés en comparant les aires sous les courbes de diminution de la fluorescence entre les échantillons et le blanc. Les résultats sont comparés au Trolox comme témoin positif et exprimés en micromoles d'équivalents de Trolox (TE) par milligramme d'échantillon ($\mu\text{mol TE/mg}$).

4.1.3.3 Activité anti-inflammatoire sur des macrophages de souris

Le test anti-inflammatoire consiste à mesurer l'inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) synthétisé par des macrophages de souris (RAW 264.7). Le mode opératoire est décrit dans l'article de D. Dufour (Dufour *et al.* 2007) avec quelques modifications. Des plaques de 96 puits sontensemencées avec $7,5 \times 10^5$ cellules et 100 μL de milieu de culture, puis incubées pendant une nuit à 37 °C en présence de 5% de CO_2 sous atmosphère humidifiée. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec des concentrations croissantes d'échantillons, ou avec un contrôle positif de N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). La plaque est mise à incuber dans les mêmes conditions que précédemment pendant 24 heures, avant que les cellules soient stimulées avec une solution à 100 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS), dans le but de provoquer une réaction inflammatoire des macrophages et de stimuler la production de NO. Après 24h d'incubation, les surnageants sont récoltés, puis mis au contact du réactif de Griess (Green *et al.* 1990) qui permet de mettre en évidence la présence de NO par dosage colorimétrique. L'absorbance des puits est enfin mesurée par un lecteur de plaque Varioskan réglé à 540 nm, en comparaison à des standards de nitrite de sodium (NaNO_2).

Tableau 8 - Activités cytotoxiques des extraits successifs des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L.

	IC ₅₀ (µg/mL)					
	Resazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Hexane	7,3 ± 0,5	9,6 ± 0,5	20 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	24 ± 4
MeOH	>200	>200	>200	181 ± 17	>200	>200
MeOH:H₂O	>200	>200	>200	>200	>200	>200
AcOEt	68 ± 9	27 ± 2	30 ± 5	49 ± 2	18 ± 3	36 ± 6
BuOH	>200	>200	>200	>200	>200	>200
H₂O	184 ± 20	>200	>200	>200	>200	>200
Etoposide	13 ± 2 µM	6,2 ± 0,8 µM	6 ± 2 µM	7,1 ± 1,0 µM	5,1 ± 0,7 µM	10 ± 2 µM

Tableau 9 - Activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits successifs des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L.

	Antioxydant ORAC (µmol Trolox/mL)	Antioxydant cellulaire IC ₅₀ sur WS1 (µg/mL)	Anti-inflammatoire IC ₅₀ sur RAW 264.7 (µg/mL)
Hexane	12,8 ± 1,7	9 ± 2	11,2 ± 0,9
MeOH	1,4 ± 0,2	145 ± 48	> 160
MeOH:H₂O	13,0 ± 2,5	2,7 ± 0,2	26 ± 2
AcOEt	91,8 ± 11,5	0,38 ± 0,04	> 160
BuOH	26,1 ± 2,7	6,5 ± 0,7	69 ± 2
H₂O	5,4 ± 0,5	22 ± 4	> 160
Quercetin	29,1 ± 3,7	0,27 ± 0,02 µM	/
L-NAME 250 µM (%inhibition)	/	/	70 ± 7
L-NAME 1 mM (%inhibition)	/	/	86 ± 4

Dans un premier temps, les résultats de tests biologiques, ont permis de sélectionner un extrait brut pour la suite du projet. L'extrait hexane a tout d'abord été mis à l'écart à cause de sa faible quantité. Malgré des résultats légèrement supérieurs de l'extrait MeOH:H₂O face à l'extrait MeOH, ce dernier a été choisi pour la suite de l'étude à cause des quantités respectives obtenus après extraction, de 11,91 et 69,95 g. De plus, l'étude qualitative par CCM a démontré une grande quantité de saccharides dans cet extrait aqueux, ceux-ci n'étant pas les composés d'intérêts souhaités pour cette étude.

Cet extrait méthanolique a donc ensuite été soumis à une seconde séparation liquide-liquide, basée sur la différence de polarité des solvants utilisés : acétate d'éthyle (AcOEt), butanol (BuOH) et eau (H₂O). Les résultats aux tests antioxydants et anti-inflammatoires mais surtout l'analyse qualitative par CCM (Figure 10) a été primordiale pour déterminer la fraction à utiliser selon les objectifs visés.

La fraction butanolique a été sélectionnée à partir des critères similaires énoncés précédemment, pour l'étude des saponines triterpéniques. Suite à une étude préliminaire par CCM et LC-MS, la fraction BuOH présentait également une plus grande diversité de composés et suggérait une certaine facilité pour l'identification et l'isolation de saponines triterpéniques. Dans un premier temps, un fractionnement bio-guidé a donc été effectué sur l'extrait BuOH à l'aide des différentes méthodes expliquées dans la section suivante (Chapitre 4.2).

La fraction AcOEt, a été quant à elle sélectionnée pour l'étude et l'obtention de fractions enrichies en composés phénoliques grâce à sa grande quantité et diversité en polyphénols. De plus, l'activité antioxydante avérée, a présenté un grand intérêt, tel que décrit dans l'article scientifique. Les travaux à ce sujet, non-présentés dans l'article, seront décrits dans le chapitre 4.3..

SOUS-CHAPITRE 4.2

ÉTUDES DES FRACTIONS ENRICHIES EN SAPONINES TRITERPÉNIQUES

4.2.1 Fractionnement de l'extrait BuOH

4.2.1.1 Chromatographie liquide sur résine Diaion HP-20

L'extrait BuOH des rhizomes d'*Aralia nudicaulis*, a dans un premier temps été fractionné « grossièrement » à l'aide d'une chromatographie liquide sur résine Diaion HP-20 tel que montré à la Figure 14 (A). Cette résine est un polymère de styrène-divinylbenzène sous forme de particules poreuses, allant de 250 à 850 μm , avec des pores d'une grosseur moyenne de 26 nm selon le fournisseur Sigma-Aldrich. Les différents éluants ont été sélectionnés à l'aide de tests de séparation par CCM. Ceux-ci étaient constitués d'un mélange MeOH:H₂O allant de 0% à 100% de solvant organique. Les paliers ont été définis selon les extraits traités et à l'aide d'un suivi CCM de la séparation. De plus, les séparations ont été suivies d'un lavage à l'AcOEt ainsi que d'un re-conditionnement de la résine avec de l'eau.

4.2.1.2 Chromatographie liquide sur gel de silice

Une chromatographie liquide sur gel de silice a ensuite été réalisée sur les fractions F à J obtenues précédemment, pour effectuer un fractionnement plus spécifique, par affinité des composés entre plusieurs phases mobiles de polarités différentes et le gel de silice. L'éluant optimal utilisé a été un mélange CHCl₃:MeOH:H₂O en proportion 26:14:3, maintenu de manière isocratique (Figure 14 (B)).

La majeure partie de ces séparations ont été réalisées sur un système de chromatographie liquide à basse pression, équipé d'un détecteur UV ainsi que d'un collecteur de fraction. Les phases stationnaires utilisées étaient des cartouches SiliaSep Flash Cartridge Silicia du

fournisseur SiliCycle ou bien une colonne en verre de 5cm de diamètre pour 46cm de longueur remplie manuellement avec 400g de silice ZEOprep 60 ECO 40-63 μm .

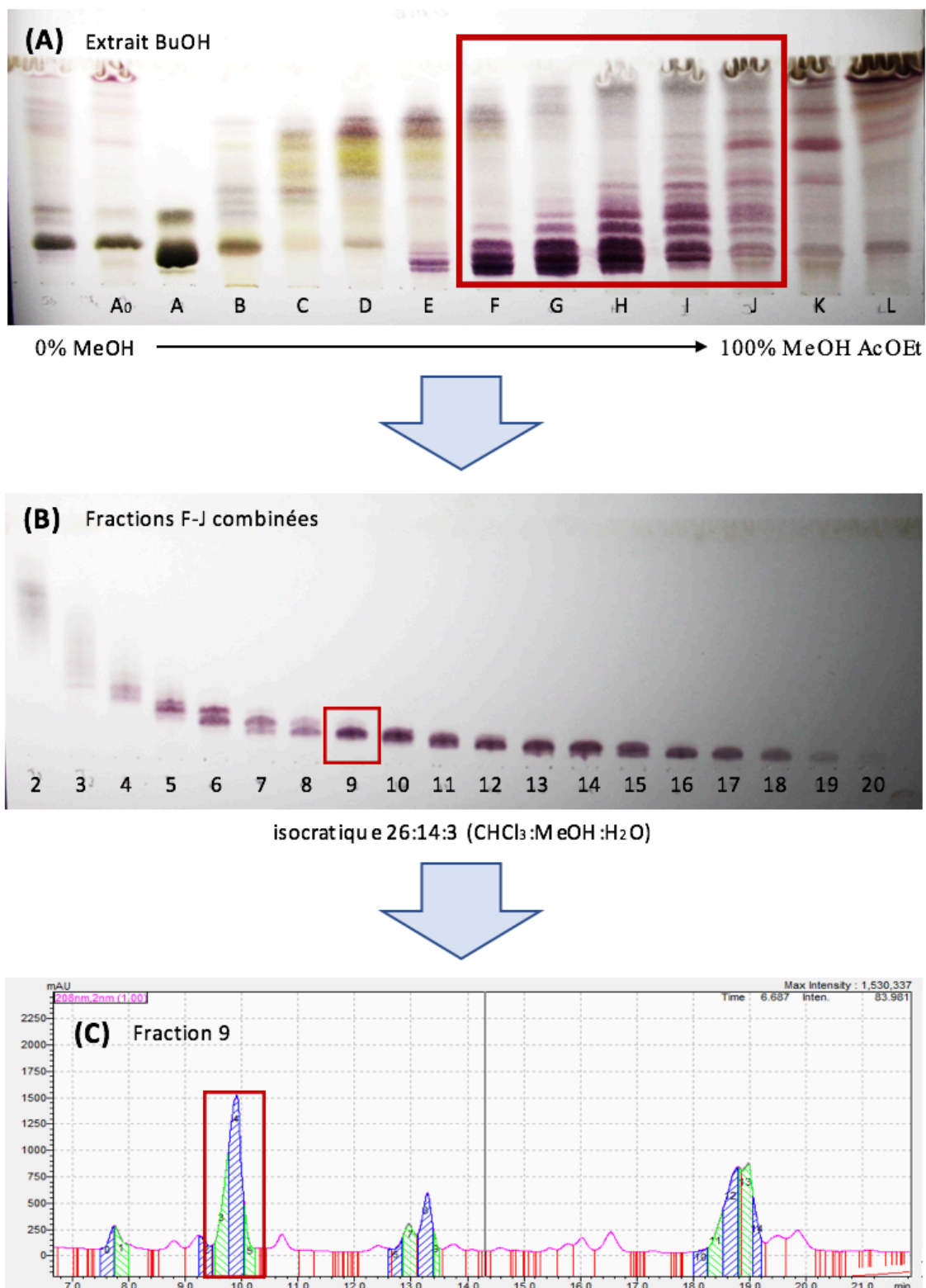


Figure 14 – (A) Purification de l'extrait BuOH sur résine diaion HP-20 (B) Purification des fractions F à J sur gel de silice (C) Purification de la fraction 9 sur HPLC préparative - CHCl_3 :MeOH: H_2O (26:14:3) – H_2SO_4

4.2.1.3 Chromatographie liquide préparative RP-HPLC-DAD/UV

Afin d'isoler les différents composés triterpéniques ciblés, les fractions sélectionnées ont été fractionnées par chromatographie liquide haute performance préparative. Ce système est relativement similaire au système HPLC analytique à l'exception que les quantités injectables sont plus importantes et que ce procédé permet la collecte de fraction à la sortie de la colonne en se basant sur un mode de détection classique (UV/DAD). Les méthodes sont donc développées et optimisées au préalable sur une HPLC analytique à l'aide d'une colonne similaire mais de dimension réduite. Les éluants utilisés ont été des mélanges d'acétonitrile et d'eau, acidifiés avec 0,1 % d'une solution d'acide formique (HCOOH). Les purifications ont été effectuées sur une colonne Kinetex 5 μ XB-C18 (100 Å 250 x 21,20 mm) de chez Phenomenex. Le débit était de 1 mL/min avec des volumes et quantités d'injections variables selon les échantillons.

La longueur optimale l'identification des saponines triterpéniques sur les chromatogrammes est de 207 ± 4 nm (Figure 14 (C)). Cette méthode a permis d'isoler 12 molécules relativement pures. En revanche, les trop faibles quantités obtenues n'ont permis que des élucidations partielles.

Le schéma d'isolation des différents composés purs sont reportés dans la Figure 15.

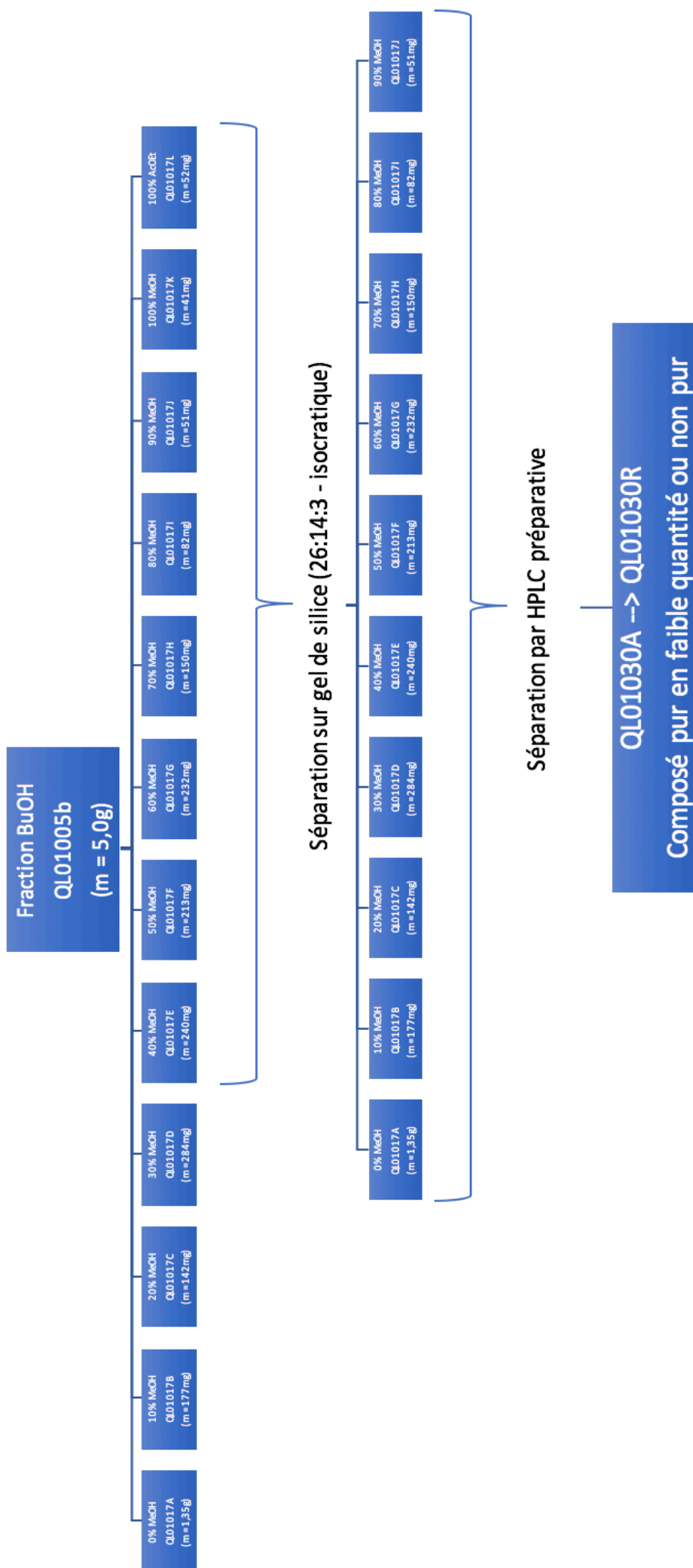


Figure 15 - Organigramme de fractionnement de la fraction BuOH

4.1.2.4 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Malgré les faibles quantités, des élucidations partielles ont pu être réalisées à l'aide d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire 400 MHz Bruker. L'appareil a permis l'acquisition de spectres 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135, APT, TOCSY) et 2D (^1H - ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC). Les déplacements chimiques (δ) sont rapportés en parties par million (ppm) et calibrés sur le pic du tétraméthylsilane (TMS).

La RMN, couplée aux données de spectrométrie de masse nous permet de confirmer la présence de glycosides de saponines triterpéniques composés de 2 à 5 unités osidiques réparties sur les positions 3 et 28 de la génine. Les deux différentes génines mises en évidence grâce aux comparaisons avec la littérature sont : l'hédéragénine et l'acide oléanolique. Les signaux associés aux carbones des positions 3 et 28 possèdent un fort déblindage, dû respectivement à la fonction hydroxyle ($\approx 88\text{ppm}$) et acide carboxylique ($\approx 177\text{ppm}$). De plus, ces deux aglycones possèdent une insaturation entre les carbones 12 et 13, déblindant considérablement le carbone en position 12 ($\approx 123\text{ppm}$). L'hédéragénine étant un dérivé de l'acide oléanolique, sa structure possède les mêmes signaux spécifiques que cités ci-dessus. En revanche la présence de la fonction hydroxyle en position 23, modifie spécifiquement les déplacements chimiques du proton ($\approx 3,72/4,31\text{ppm}$) et du carbone ($\approx 64,7\text{ppm}$) considéré.

Les tableaux 15, 16 et 17 présentent les données RMN respectives des trois composés les plus purs, dont les structures ont pu être proposées dans la pyridine. Cependant l'isolation d'une quantité plus importante serait nécessaire pour confirmer ces structures.

Les deux premières structures proposées (Figure 16) sont des glycosides d'hédéragénine. La première structure est glycosylée en position 3 et 28 avec la présence de 2 protons anomériques aux déplacements chimiques respectifs δ 5.33 ppm (d, $J=7.3$ Hz, 3-O-Ara) et δ 6.26 ppm (d, $J=8.1$ Hz, 28-O-Glc). La structure proposée est donc celle de l'hédéragénine-3-arabinosyl-28-glucosyl. Le deuxième composé partiellement identifié, semble correspondre à l'hédéragénine-28-diglucosyl avec des protons anomériques correspondants aux déplacements chimiques suivants : δ 6.26 ppm (d, $J=8.0$ Hz, 28-O-Glc) et δ 5.04 ppm (d, $J=7.8$ Hz, Glc-6'-Glc).

Finalement, la troisième structure (Figure 16), supposée être l'acide oléanolique-28-O-diglucoside-3-glucuronide, a été solubilisée également dans la pyridine. Son spectre ^1H a

démontré la présence de trois protons anomériques aux déplacements chimiques δ 6.26 (d, $J=7.9$ Hz, 28-O-Glc), δ 4.71 (d, $J=7.7$ Hz, Glc-6'-Glc), et δ 3.28 (d, $J=5.3$ Hz, 3-O-GlcA). Le spectre ^{13}C a révélé un carbone à δ 174.1 ppm qui n'est couplé à aucun proton, ce dernier est caractéristique du groupement acide carboxylique présent sur la position C-6 de l'acide glucuronique.

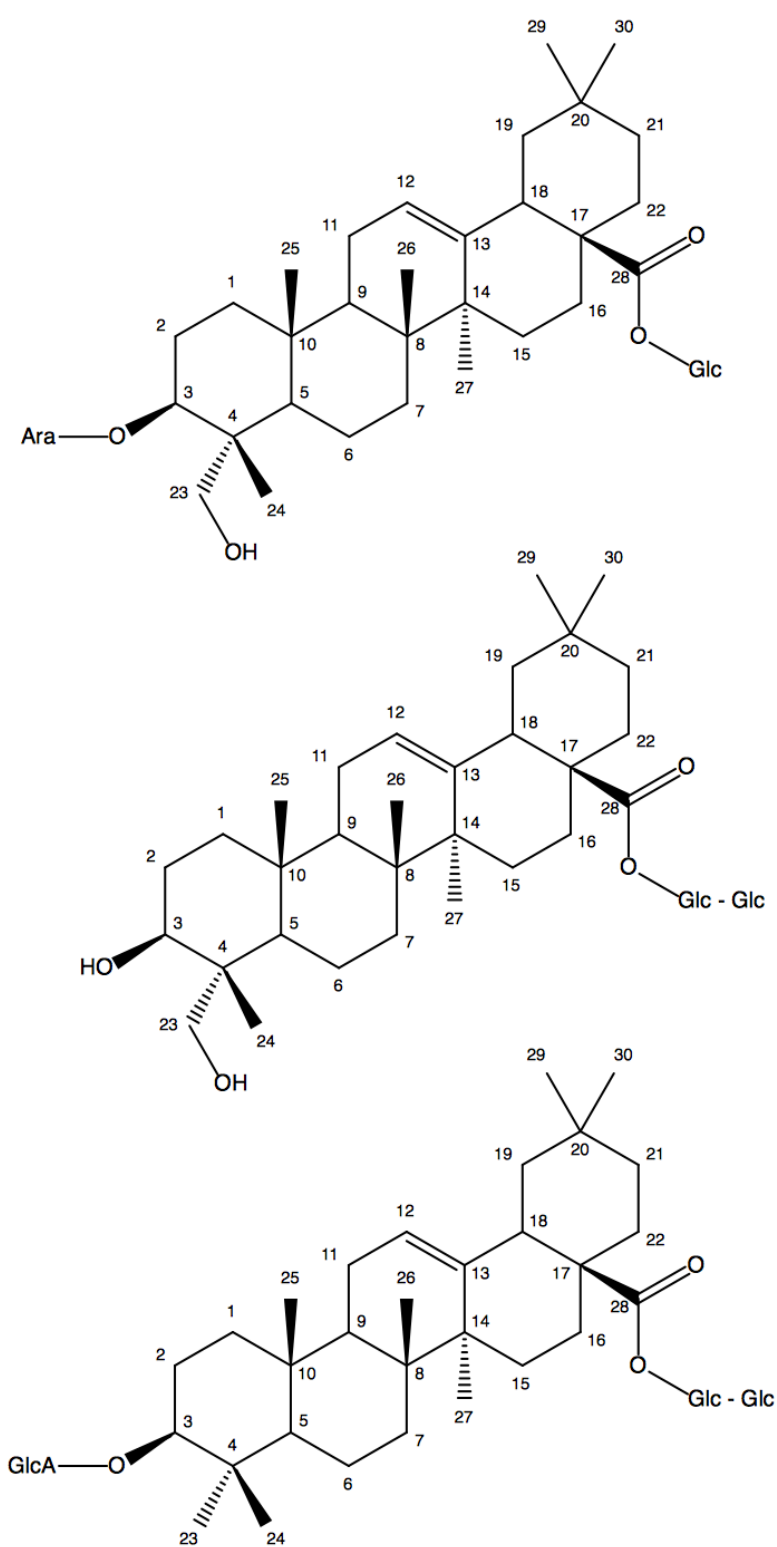


Figure 16 - Structures hypothétiques élucidées à partir de l'extrait BuOH des rhizomes d'*Aralia nudicaulis*

Tableau 11 - Données RMN du composé QL01030B

HEDERAGENINE						GLUCOSE		GLUCOSE
	P	δC	MC	δH1	δH2			
G	1	38,82	CH2	1,42	0,86			
G	2	26,25	CH2	2,29	2			
G	3	83,61	CH	4,31				
G	4	40,05	C					
G	5	48,23	CH	1,69				
G	6	18,33	CH2	1,86	1,31			
G	7	32,92	CH2	1,57				
G	8	40,05	C					
G	9	47,745	CH	1,61				
G	10	36,98	C					
G	11	23,94	CH2					
G	12	123,034	CH	5,39				
G	13	144,29	C					
G	14	42,26	C					
G	15	28,44	CH2	2,29	1,08			
G	16	23,49	CH2					
G	17	46,834	C					
G	18	41,79	CH	3,16				
G	19	46,292	CH2	1,69	1,17			
G	20	30,88	C					
G	21	34,09	CH2	1,08				
G	22	32,69	CH2	1,84	1,75			
G	23	64,4	CH2	3,72				
G	24	13,7	CH3	1,05				
G	25	16,32	CH3	0,93				
G	26	17,69	CH3	1,11				
G	27	26,25	CH3	1,19				
G	28	176,67	C					
G	29	33,24	CH3	0,85				
G	30	23,79	CH3	0,85				
S-28	1	95,78	CH	6,26				
S-28	2	73,98	CH	4,13				
S-28	3	78,48	CH	4,21				
S-28	4	71	CH	4,35				
S-28	5	78,09	CH	4,1				
S-28	6	69,52	CH2	4,36	4,7			
S-28-6	1	105,42	CH	5,04				
S-28-6	2	75,27	CH	4,01				
S-28-6	3	78,83	CH	4,22				
S-28-6	4	71,59	CH	4,21				
S-28-6	5	78,59	CH	3,88				

Tableau 10 - Données RMN du composé QL01030I

HEDERAGENINE						GLUCOSE		ARABINOSE
	P	δC	MC	δH1	δH2			
G	1	38,82	CH2	1,42	0,86			
G	2	26,25	CH2	2,29	2			
G	3	83,61	CH	4,31				
G	4	40,05	C					
G	5	48,23	CH	1,69				
G	6	18,33	CH2	1,86	1,31			
G	7	32,92	CH2	1,57				
G	8	40,05	C					
G	9	47,745	CH	1,61				
G	10	36,98	C					
G	11	23,94	CH2					
G	12	123,034	CH	5,39				
G	13	144,29	C					
G	14	42,26	C					
G	15	28,44	CH2	2,29	1,08			
G	16	23,49	CH2					
G	17	46,834	C					
G	18	41,79	CH	3,16				
G	19	46,292	CH2	1,69	1,17			
G	20	30,88	C					
G	21	34,09	CH2	1,08				
G	22	32,69	CH2	1,84	1,75			
G	23	64,4	CH2	3,72				
G	24	13,7	CH3	1,05				
G	25	16,32	CH3	0,93				
G	26	17,69	CH3	1,11				
G	27	26,25	CH3	1,19				
G	28	176,67	C					
G	29	33,24	CH3	0,85				
G	30	23,79	CH3	0,85				
S-28	1	95,78	CH	6,26				
S-28	2	73,98	CH	4,13				
S-28	3	78,48	CH	4,21				
S-28	4	71,59	CH	4,21				
S-28	5	78,09	CH	4,1				
S-28	6	62,7	CH2	4,36	4,47			
S-3	1	106,87	CH	5,330				
S-3	2	73,18	CH	4,600				
S-3	3	75,09	CH	4,190				
S-3	4	69,74	CH	4,680				
S-3	5	69,52	CH2	4,370	4,73			

Tableau 12 - Données RMN du composé QL01030H

	P	dC	MC	dH1	dH2	
G	1	38,94	CH2	1,34	0,77	ACIDE OLEANOLIQUE
G	2	26,92	CH2	2,19	1,82	
G	3	89,42	CH	3,28		
G	4	39,83	C			
G	5	56,04	CH	0,72		
G	6	18,77	CH2	1,45	1,27	
G	7	33,43	CH2			
G	8	40,12	C			
G	9	48,27	CH	1,58		
G	10	37,18	C			
G	11	23,65	CH2			
G	12	123,08	CH	5,4		
G	13	144,42	C			
G	14	42,39	C			
G	15	28,57	CH2	2,3	1,15	
G	16	24,04	CH2			
G	17	47,3	C			
G	18	41,95	CH	3,18		
G	19	46,51	CH2	1,74	1,22	
G	20	31,04	C			
G	21	34,27	CH2	1,32	1,08	
G	22	32,82	CH2	1,87	1,76	
G	23	28,42	CH3	1,28		
G	24	17	CH3	1,1		
G	25	15,89	CH3	0,85		
G	26	17,78	CH3	1,1		
G	27	26,38	CH3	1,26		
G	28	176,8	C			
G	29	33,43	CH3	0,89		
G	30	23,94	CH3	0,88		
S-28	1	95,92	CH	6,26		GLUCOSE
S-28	2	74,12	CH	4,14		
S-28	3	78,61	CH	4,23		
S-28	4	71,13	CH	4,36		
S-28	5	78,22	CH	4,1		
S-28	6	69,75	CH2	4,71	4,36	
S-28-6	1	105,5	CH	5,04		GLUCOSE
S-28-6	2	75,39	CH	4,01		
S-28-6	3	78,68	CH	4,22		
S-28-6	4	71,72	CH	4,2		
S-28-6	5	78,61	CH	3,88		
S-28-6	6	62,84	CH2	4,37		
S-3	1	105,58	CH	5,03		GLUCURONIDE
S-3	2	75,16	CH	4,19		
S-3	3	78,15	CH	4,29		
S-3	4	73,44	CH	4,58		
S-3	5	78,7	CH	3,89		
S-3	6	174,1	C			

SOUS-CHAPITRE 4.3

ÉTUDES DES FRACTIONS ENRICHIES EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

4.3.1 Fractionnement de l'extrait AcOEt

4.3.1.1 Fractionnement sur résine diaion HP-20

Le but de l'étude portant sur les composés phénoliques dans l'extrait AcOEt était d'identifier et quantifier les composés phénoliques majoritaires ainsi qu'évaluer leur contribution dans les différentes activités biologiques observées. L'extrait AcOEt des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* a dans un premier temps également été soumis à un fractionnement « grossier » à l'aide d'une chromatographie liquide sur résine Diaion HP-20, tel que présenté dans la Figure 18. Les différents éluants ont été sélectionnés à l'aide de tests de séparation par CCM. Ceux-ci étaient constitués d'un mélange MeOH:H₂O allant de 0% à 100% avec des mélanges intermédiaires de 20%, 50% et 80% de MeOH. De plus, les séparations étaient suivies d'un lavage à l'AcOEt ainsi que d'un re-conditionnement de la résine avec de l'eau. Par leurs profils chromatographiques très similaires, les fractions 80% et 100% MeOH ont été rassemblées avant d'être analysées (Figure 17). La fraction 50% semble être la fraction la plus enrichie en composés phénoliques. Pour cette raison, la publication traitant de l'activité inhibitrice de la production de ROS se base sur cette fraction enrichie et appelée EFPC.

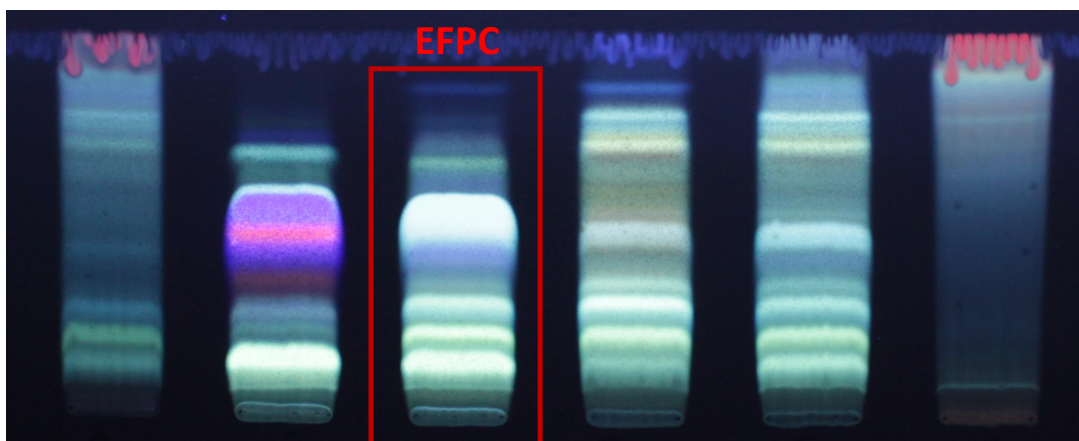


Figure 17 - CCM récapitulative du fractionnement de la fraction AcOEt sur résine diaion HP-20 – CHCl₃:MeOH:H₂O (26:14:3) – NP-PEG (365nm)

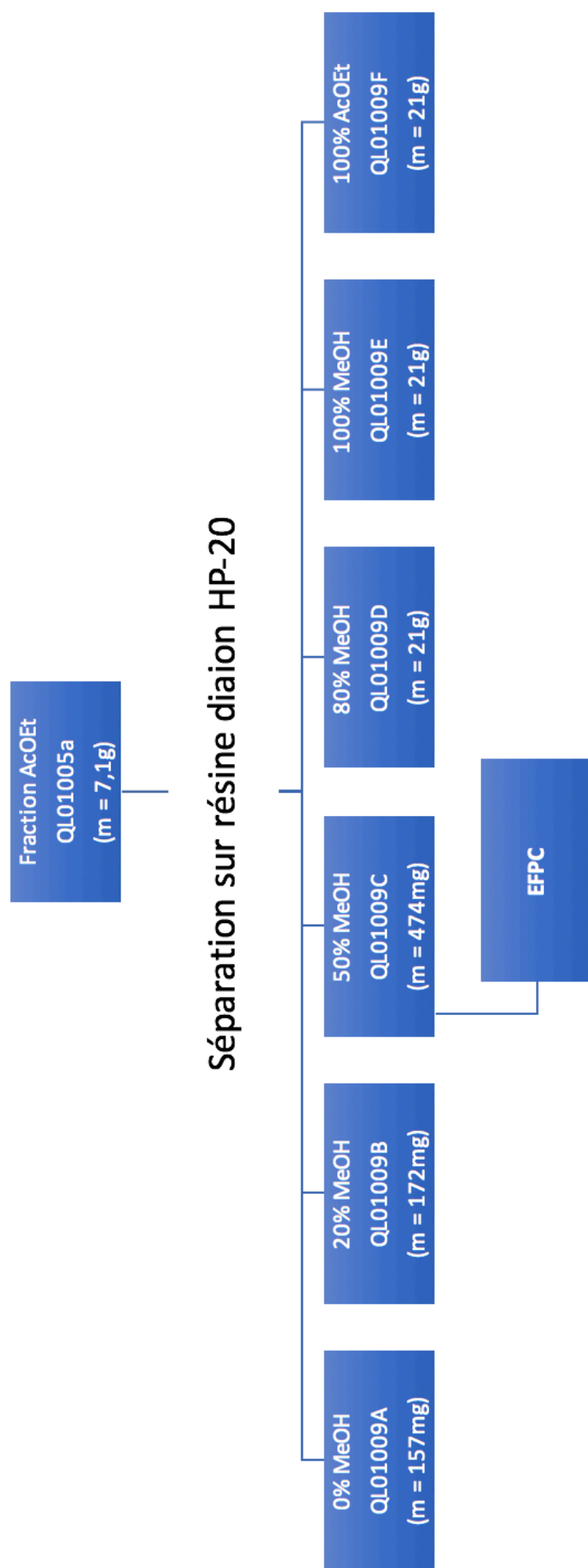


Figure 18 - Organigramme de fractionnement de la fraction AcOEt

4.3.1.2 HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)

Tout au long de ce projet, l'analyse des extraits et fractions à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute performance, couplé à un spectromètre de masse (RP-HPLC-DAD/UV-ESI-APCI-MS) a été nécessaire pour analyser précisément leurs compositions. Cependant, l'intérêt principal de cette technique dans l'étude des composés phénoliques, était l'identification et la quantification des composés phénoliques majoritaires à l'aide de standards. Le système HPLC-MS utilisé était constitué d'une colonne de type C-18 (Kinetex 5 μ XB-C18 100A 250x4.6 mm) achetée de Phenomenex. Les injections s'effectuaient avec des échantillons préalablement filtrés à 0,45 μ m pour un volume de 10 μ L.

La phase mobile avait pour débit 1 mL/min et était constituée de différents mélanges ACN:H₂O ou MeOH:H₂O avec une augmentation graduelle du pourcentage en solvant organique. Les longueurs d'ondes d'analyse programmées étaient de 210 ; 254 ; 280 ; 320 ; 365 nm. Suite à des tests préliminaires d'ionisation, le spectromètre de masse a été réglé sur le mode d'ionisation négatif pour l'analyse des composés phénoliques. Grâce à la méthode décrite

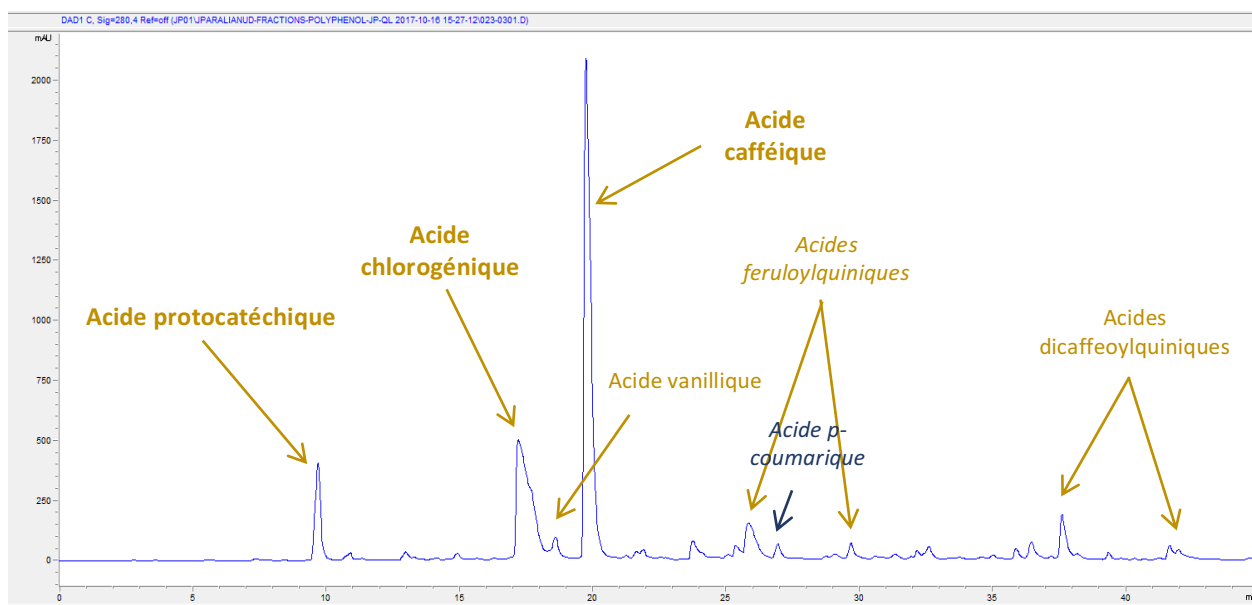


Figure 19 - Chromatogramme HPLC (280nm) de la fraction EFPC

précédemment, l'identification des 3 composés phénoliques majoritaires et 6 minoritaires a pu être réalisée et confirmée en majorité par l'injection de témoins commerciaux (sauf l'acide p-coumarique) (Figure 19).

Pour les composés majoritaires et identifiés comme potentiels marqueurs chimiques, l'HPLC-MS a permis de les quantifier selon la méthode décrite.

L'ensemble des travaux sur les composés de nature phénolique est rassemblé dans l'article scientifique du chapitre 3.

4.3.1.3 Tests cosmétiques

4.3.1.3.1 Tests d'inhibition enzymatique

- Collagénase

L'évaluation de l'inhibition de la collagénase est effectuée au moyen de « EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit » fournit par Molecular Probes. Pour ce test, un substrat de collagène conjugué à un marqueur fluorescent est utilisé afin de définir l'activité à l'aide de mesures fluorométriques. L'extrait concerné est déposé à 4 différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 µg/ml), tandis que la 1,10-phénantroline monohydrate (Sigma-Aldrich, 320056) est utilisée comme contrôle positif (0,063, 0,125, 0,25, 0,5mM). Les échantillons ont été dilués dans du tampon de réaction (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, CaCl₂ 50 mM et azoture de sodium 2 mM; pH 7.6). Ensuite, 20 µl d'une solution de collagène de type 1 conjugué à la fluoresceine (Molecular Probes, D-12060) est ajoutée dans chaque puits. La collagénase de Clostridium (Sigma, C0130) est diluée dans le tampon de réaction pour obtenir une concentration finale de 0,1 U/ml. Un volume de 100 µl de la dilution d'enzyme est ajouté aux extraits et aux contrôles positifs. Le tampon de réaction seul est également ajouté en guise de blanc (100 µl). Par la suite, les plaques sont incubées à température pièce et à l'abri de la lumière afin de protéger la fluoresceine. Finalement, la fluorescence est mesurée au moyen d'un fluorimètre Varioskan (λ excitation : 495 nm, λ émission : 515 nm). L'activité est mesurée en pourcentage d'inhibition.

Le pourcentage d'inhibition de la collagénase est mesuré au moyen du calcul suivant :

$$\% \text{ Inhibition de la collagénase} = \left[1 - \left(\frac{B}{A} \right) \right] * 100 \%$$

« A » étant l'absorbance du contrôle solvant et « B » pour l'absorbance de l'extrait ou du contrôle moins l'absorbance de son blanc.

Les résultats ci-dessous (Figure 20) montre une très modeste activité anti-collagénase même à une concentration de 200 µg/mL pour l'EFPC, en comparaison avec la 1,10-phénanthroline.

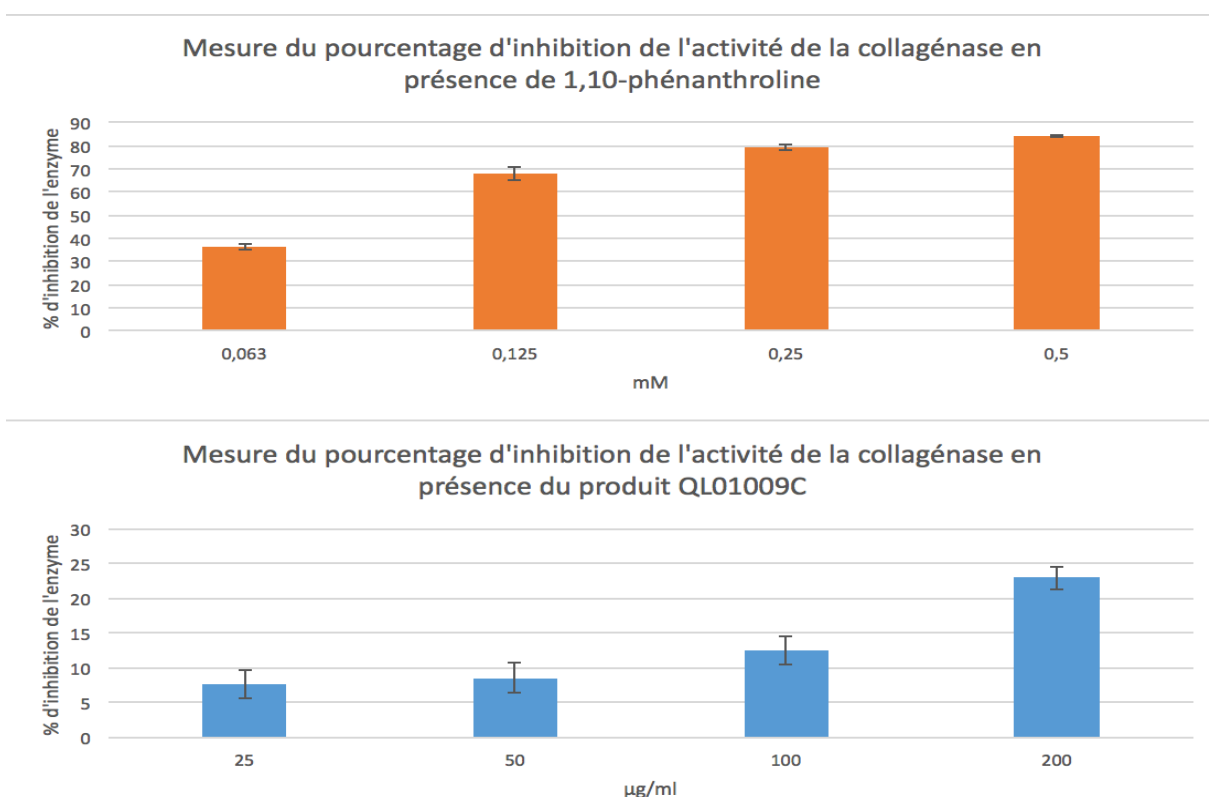


Figure 20 - Mesure du pourcentage d'inhibition de l'activité de la collagénase

- Élastase

L'évaluation de l'inhibition de l'élastase est effectuée à partir de la spectrophotométrie en utilisant l'élastase pancréatique porcine et le N-Succ-(Ala)-3-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich, S4760) en tant que substrat. Le substrat est dilué dans un tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8) pour obtenir une concentration finale de 1,6 mM. Dans des microplaques à 96 puits, des concentrations finales croissantes d'extraits variant de 12,5 à 100 µg/ml (50 µl par puits) sont préincubées pendant 15 minutes à 25°C avec 75 µl d'élastase (3,33 µg/ml). Chaque extrait est accompagné d'un blanc constitué de tous les éléments excepté l'élastase. L'acide oléanolique est utilisé en tant que contrôle positif à des concentrations similaires à l'extrait. Par la suite, la plaque est incubée durant une période de 10 à 20 minutes à température ambiante. Après l'incubation, 125 µl de substrat sont ajoutés dans tous les puits. Finalement, une lecture de l'absorbance est effectuée sur une période de 20 minutes à 410 nm avec l'aide du spectrophotomètre automatisé Varioskan.

Le pourcentage d'inhibition de l'élastase est mesuré au moyen du calcul suivant :

$$\% \text{ Inhibition de l'élastase} = \left[1 - \left(\frac{B}{A} \right) \right] * 100 \%$$

« A » étant l'absorbance du contrôle solvant et « B » pour l'absorbance de l'extrait ou du contrôle moins l'absorbance de son blanc.

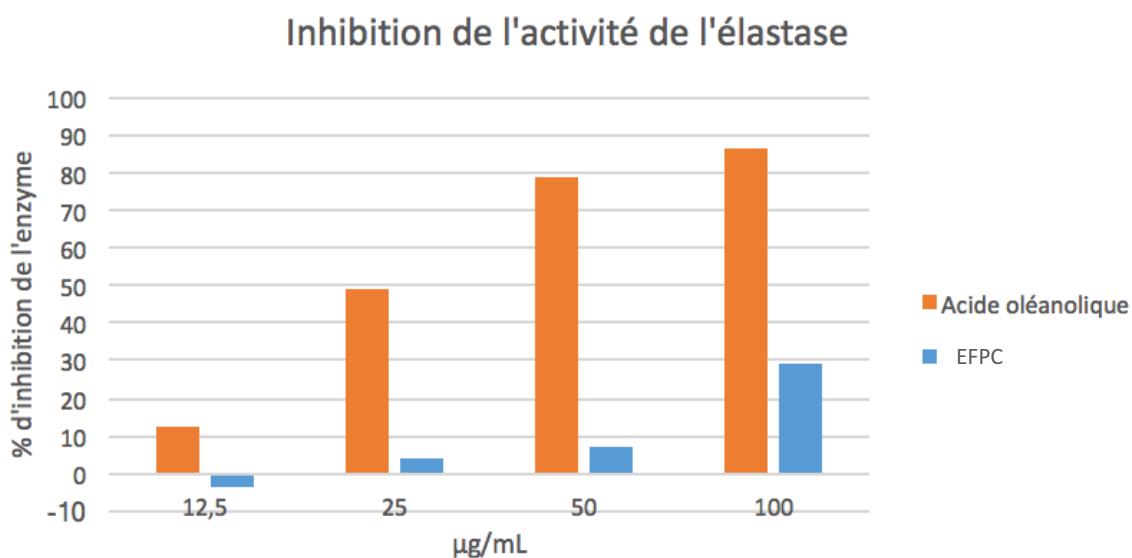


Figure 21 - Mesure du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'élastase

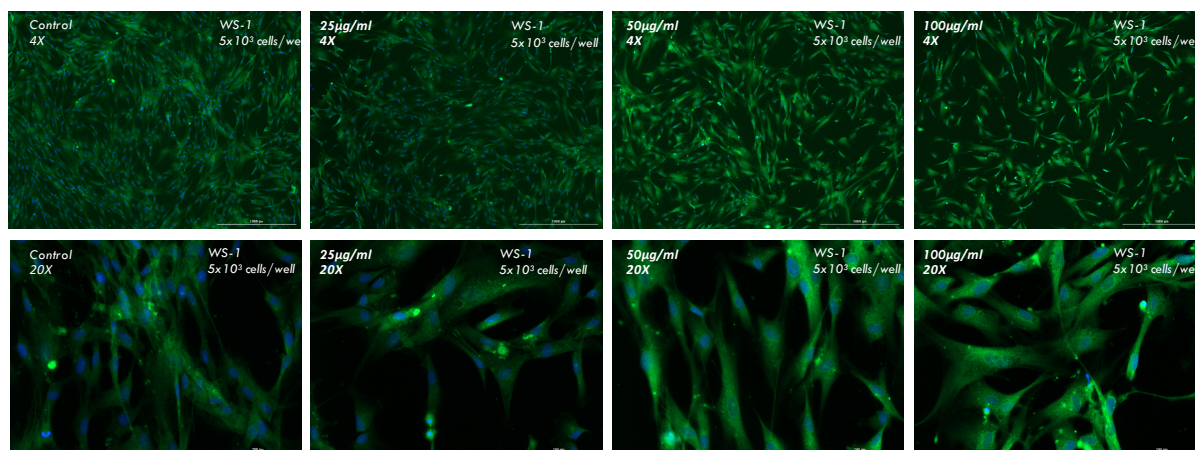
En comparaison avec une activité inhibitrice de 87% à 100 µg/ml pour l'acide oléanolique, utilisé en tant que témoin positif, l'activité de l'extrait est environ 3 fois moindre, avec un pourcentage d'inhibition de près de 30% suggérant une activité notable, mais tout de même relativement modeste (Figure 21).

Cette fraction ne présente donc que de faibles activités inhibitrices de la collagénase et l'élastase.

4.3.1.3.2 Tests d'immunofluorescence indirecte

- Involucrine et Elastine

Pour l'évaluation de la stimulation d'involucrine par l'EFPC, les cellules utilisées sont des kératinocytes HaCaT, tandis que pour l'étude concernant l'élastine, les cellules utilisées sont des fibroblastes WS-1. Celles-ci sontensemencées à une densité cellulaire d'environ 5000 cellules/puits, incubées au préalable 24 heures à 37°C avec 5% de CO₂ pour permettre leur adhérence. Un premier traitement avec un anticorps primaire permet de reconnaître la protéine d'intérêt (Anticorps primaire involucrine : ab28057 lotGR159374-3 1:1000 ; Anticorps primaire élastine : ab21610 lotGR134273-12 1:400). Dans un second temps, un anticorps secondaire conjuguée à un fluorochrome (GFP) vient se fixer sur le premier pour permettre une mesure fluorométrique. L'anticorps secondaire utilisé dans ces travaux est le Alexa fluor 488-conjugated affiniPure Goat anti-rabbit lot120234.



Intensité lumineuse GFP en fonction du nombre de WS-1 après un traitement de 48 heures à différentes concentrations

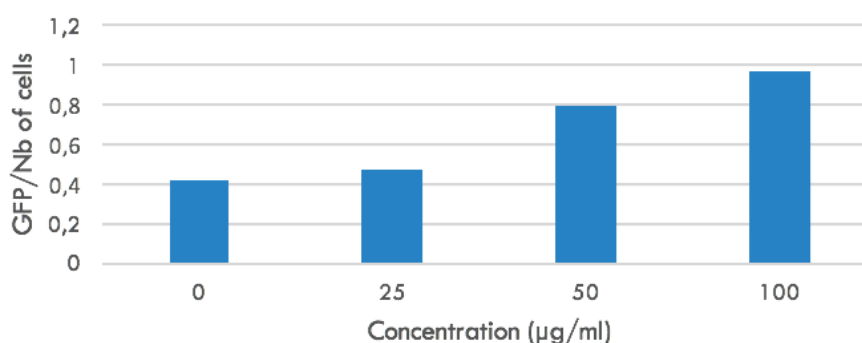
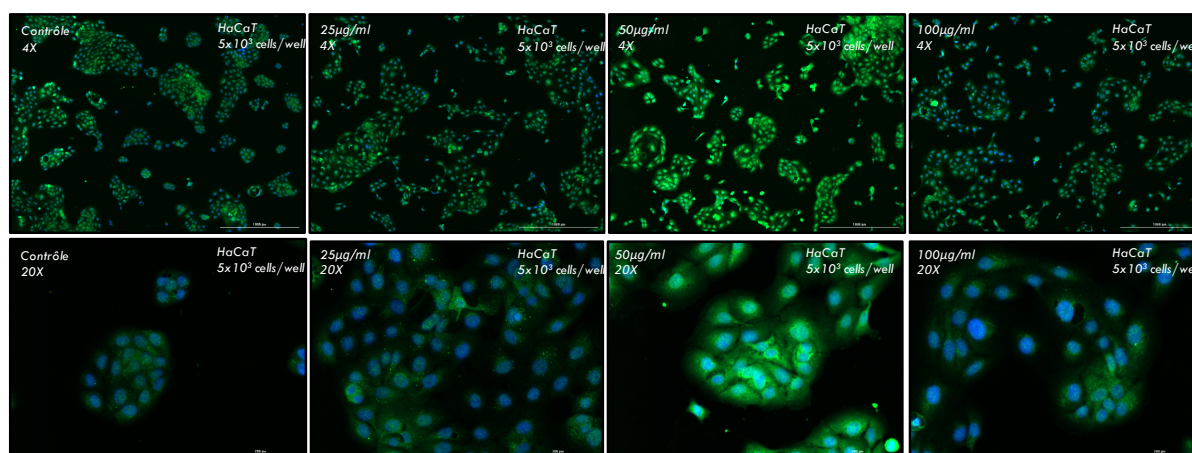


Figure 22 - Évaluation de la stimulation de production d'élastine sur WS-1

Les images présentées dans la Figure 22, démontrent une faible production protéique dans les puits comportant 0 et 25 $\mu\text{g/ml}$. Cependant, on remarque visuellement que la fluorescence des fibroblastes WS-1 augmente légèrement au-delà de 50 $\mu\text{g/ml}$, démontrant une grande concentration d'anticorps secondaires fixés et donc la stimulation de production d'élastine par l'extrait EFPC.



Intensité lumineuse GFP en fonction du nombre de WS-1
après un traitement de 48 heures à différentes
concentrations

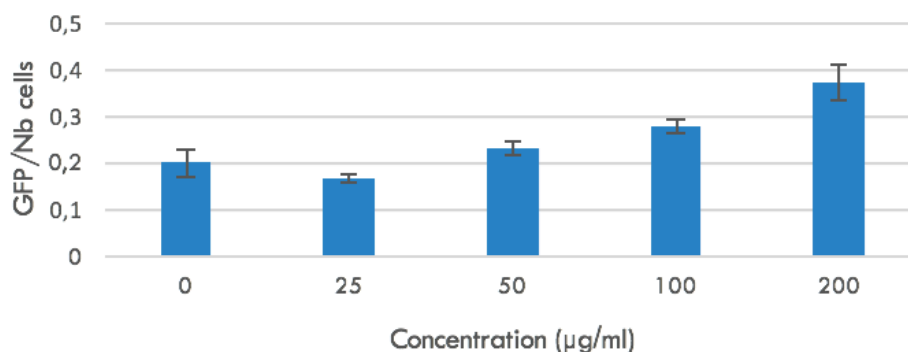


Figure 23 - Évaluation de la stimulation de production d'involucrine sur HaCaT

Lorsque l'on observe la Figure 23, la stimulation de la production d'involucrine sur des fibroblastes WS-1, les images de fluorescence indirecte suggèrent une stimulation maximale à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. La diminution de la fluorescence observée à partir des concentrations de 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$, représente une toxicité de l'extrait sur les cellules.

CONCLUSION

L'objectif principal du projet, visant à étudier la composition chimique et mieux caractériser l'activité biologique de différents extraits de rhizomes d'*Aralia nudicaulis*.

Le fractionnement des extraits bruts obtenus ont permis d'enrichir en composés phénoliques certaines fractions telle que la fraction EFPC. L'identification des composés majoritaires, à l'aide d'analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse, a démontré une grande richesse en acides phénoliques, pouvant en grande partie expliquer les résultats préliminaires concernant l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. À la suite de cette identification, il a été postulé que l'acide protocatéchique, l'acide chlorogénique et l'acide caféique semblaient être de bons candidats pour la détermination de marqueurs chimiques et biologiques. Une méthode a donc été mise en place et optimisée pour la quantification de ces derniers. Cette méthode a été validée en termes de linéarité, précision intra et inter journalière et fiabilité. L'ensemble des paramètres utilisés pour la validation de cette méthode sont en accord avec les instructions de la Conférence International sur l'Harmonisation (ICH). La quantification de ces trois composés a donc été effectuée à trois stades végétatifs différents d'*Aralia nudicaulis* L. (rhizomes), afin de confirmer le choix de ces trois acides phénoliques comme marqueurs chimiques. En revanche, l'acide chlorogénique présente des variations de concentrations significatives, ce qui en fait le meilleur candidat en tant que marqueur chimique pour la standardisation d'extraits totaux de rhizomes d'*Aralia nudicaulis*. Pour les extraits totaux, l'identification de marqueurs biologiques n'a pas été possible à cause des variations non-significatives des activités antioxydantes et anti-inflammatoires désignées. L'activité biologique, a quant à elle été mise en exergue lors de l'étude de fractions enrichies en composés phénoliques. Des premiers tests préliminaires de criblage ont indiqué des activités antioxydantes et anti-inflammatoires intéressantes pour les fractions riches en composés phénoliques. Pour la fraction EFPC obtenue après fractionnement de l'extrait AcOEt, les activités décrites précédemment étaient couplées à une toxicité très faible voire inexistante envers les fibroblastes de peau humaine. Il a donc été décidé de poursuivre vers des tests cosmétiques spécifiques. À la suite de nombreux tests enzymatiques, tests d'immunofluorescence et tests d'inhibition de la production de ROS, deux activités se sont révélées prometteuses. Il a été observé que l'extrait EFPC inhibe considérablement la production de ROS induite par les irradiations UVB ou IR. De plus, les composés majoritaires seuls ont également été testés et présentent des activités significativement plus faibles que l'extrait complet. Une synergie entre les différents constituants de l'extrait semble être

envisageable, des études plus approfondies avec des mélanges de différents ratios en standards commerciaux pourraient être effectuées.

Différents glycosides de saponines triterpéniques de type oléanane ont pu être isolés et partiellement identifiés. Cependant ces élucidations structurales devront être validées à l'aide de quantités plus importantes de composés.

Ce projet constitue donc une avancée dans l'étude phytochimique des rhizomes d'*Aralia nudicaulis* L. et valide partiellement les vertus ancestrales qui lui sont conférées ou les vertus associées aux espèces phylogénétiquement proches. De plus, une méthode HPLC-MS a été mise au point et validée pour permettre la standardisation d'extraits totaux d'*Aralia nudicaulis* L.. Toutefois de nombreuses zones d'ombres persistent au sein de cette espèce ainsi qu'aux espèces endémiques du Québec, très peu étudiées et laissant donc de multiples perspectives d'avenir pour leurs études phytochimique et biologique.

Références

Adams JS, Clemens TL, Parrish JA et Holick MF. 1982. Vitamin-D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin-D-deficient subjects. *New England Journal of Medicine*, 306 : 722-725.

Adams LB, Hibbs JB, Jr., Taintor RR et Krahenbuhl JL. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol*, 144 : 2725-2729.

Afaq F, Adhami VM et Mukhtar H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571 : 153-173.

Alasalvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC et Shahidi F. 2001. Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 : 1410-1416.

Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP et Heredia JB. 2016. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2 : 1131412.

Attele AS, Wu JA et Yuan CS. 1999. Ginseng pharmacology - Multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*, 58 : 1685-1693.

Baeg IH et So SH. 2013. The world ginseng market and the ginseng (Korea). *J Ginseng Res*, 37 : 1-7.

Balupillai A, Prasad RN, Ramasamy K, Muthusamy G, Shanmugham M, Govindasamy K et Gunaseelan S. 2015. Caffeic acid inhibits UVB-induced inflammation and photocarcinogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in mouse skin. *Photochemistry and photobiology*, 91 : 1458-1468.

Barrett SCH et Helenurm K. 1981. Floral sex ratios and life history in *Aralia nudicaulis* (Araliaceae). *Evolution*, 35 : 752-762.

Beak SM, Lee YS et Kim J-A. 2004. NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie*, 86 : 425-429.

Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D et Jablecka A. 2012. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition Research*, 32 : 421-427.

Bowden GT. 2004. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat Rev Cancer*, 4 : 23-35.

Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Oxford, UK, p. 317-333.

Brekman II. 1980. Chapter 1 - THE THEORY OF PHARMACOSANATION. Dans : Brekman II éd. *Man and Biologically Active Substances*. Pergamon, p. 1-20.

Cha JW, Piao MJ, Kim KC, Yao CW, Zheng J, Kim SM, Hyun CL, Ahn YS et Hyun JW. 2014. The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomolecules & therapeutics*, 22 : 136-142.

Chang Y-C, Yang M-Y, Chen S-C et Wang C-J. 2016. Mulberry leaf polyphenol extract improves obesity by inducing adipocyte apoptosis and inhibiting preadipocyte differentiation and hepatic lipogenesis. *Journal of functional foods*, 21 : 249-262.

Chen B-H, Hung M-H, Chen JY-F, Chang H-W, Yu M-L, Wan L, Tsai FJ, Wang T-P, Fu T-F et Chiu C-C. 2012a. Anti-allergic activity of grapeseed extract (GSE) on RBL-2H3 mast cells. *Food Chemistry*, 132 : 968-974.

Chen B-T, Li W-X, He R-R, Li Y-F, Tsoi B, Zhai Y-J et Kurihara H. 2012b. Anti-inflammatory effects of a polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012 : 0-7.

Chen X-p, Lin Y, Hu Y, Liu C-X, Lan K et Jia W. 2015. Phytochemistry, Metabolism, and Metabolomics of Ginseng. *Chinese Herbal Medicines*, 7 : 98-108.

Choi KT. 2008. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C A Meyer. *Acta Pharmacol Sin*, 29 : 1109-1118.

Clement JA, Flood MJ, Bleich RM, Willis TJ, Kelly RM et Schmitt JD. 2013. Diterpenoids and acetylenic lipids from *Aralia racemosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 51 : 4-7.

Cui J, Li Y-W, Jia N, Song X-M, Duan J-L, Weng Y, Guan Y, Zhou D, Wang L, Xi M-M et Wen A-D. 2013. Insulin- secretagogue activity of eleven plant extracts and twelve pure compounds isolated from *Aralia taibaiensis*. *Life Sciences*, 92 : 131-136.

de Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, Fagg CW, Guerra ENS, de Medeiros Nóbrega YK, Silveira D, Fonseca-Bazzo Y, Simeoni LA et Homem-de-Mello M. 2016. Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PloS one*, 11 : e0163130.

de Galvez MV, Aguilera J, Sanchez-Roldan C et Herrera-Ceballos E. 2016. Infrared radiation increases skin damage induced by other wavelengths in solar urticaria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 32 : 284-290.

Denisenko PP, Zhigalov SA et Korkov VV. 2000. Search for vegetable means stimulating reproduction function. *Psychoneuroendocrinology*, 25 : S57.

Desmet P et Brouillet L. 2013. Database of Vascular Plants of Canada (VASCAN): a community contributed taxonomic checklist of all vascular plants of Canada, Saint Pierre and Miquelon, and Greenland. *PhytoKeys* : 55-67.

Di Renzo L, Rizzo M, Sarlo F, Colica C, Iacopino L, Domino E, Sergi D et De Lorenzo A. 2013. Effects of dark chocolate in a population of normal weight obese women: a pilot study.

Dou F, Xi M-m et Wen A-d. 2013. Determination of the total saponins content of *Aralia taibaiensis*. *Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi*, 19 : 76-78.

Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82 : 47-95.

Duan J, Yin Y, Cui J, Yan J, Zhu Y, Guan Y, Wei G, Weng Y, Wu X, Guo C, Wang Y, Xi M et Wen A. 2016. Chikusetsu Saponin IVa Ameliorates Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Diabetic Mice via Adiponectin- Mediated AMPK/ GSK- 3 β Pathway In Vivo and In Vitro. *Mol Neurobiol*, 53 : 728-743.

Dufour D, Pichette A, Mshvildadze V, Bradette-Hebert ME, Lavoie S, Longtin A, Laprise C et Legault J. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *J Ethnopharmacol*, 111 : 22-28.

F'Guyer S, Afaq F et Mukhtar H. 2003. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19 : 56-72.

Flanagan L et Bain J. 1988. The biological flora of Canada. 8. *Aralia nudicaulis* L., wild sarsaparilla. *Canadian field-naturalist Ottawa ON*, 102 : 45-59.

French Pharmacopoeia. **2009** *Aralia racemosa* for homeopathic preparations. ANSM.

Giada MdLR. 2013. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. Dans : *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants*. InTechOpen.

Girard-Lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720-726.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr. et Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*, 144 : 278-283.

Guo M, Zhang L et Liu Z. 2009. Analysis of Saponins from Leaves of *Aralia elata* by Liquid Chromatography and Multi-stage Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*, 25 : 753-758.

Han BH, Han YN, Han KA, Park MH et Lee EO. 1983. Studies on the anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* (I). *Archives of Pharmacal Research*, 6 : 17.

Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM et Laskin JD. 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 278 : 22432-22436.

Huang YG, Li QZ, Ivanochko G et Wang R. 2006. Novel selective cytotoxicity of wild sarsaparilla rhizome extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 : 1399-1403.

Hyun S, Jung HA, Min BS, Jung JH et Choi J. 2010. Isolation of phenolics, nucleosides, saccharides and an alkaloid from the root of *Aralia cordata*. *Natural Product Sciences*, 16 : 20-25.

International Conference on Harmonization. **2005**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

Jian-Ming L et Qizhi Yao and Changyi C. 2009. Ginseng Compounds: An Update on their Molecular Mechanisms and Medical Applications. *Current Vascular Pharmacology*, 7 : 293-302.

Jiang F et Disting GJ. 2003. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current Vascular Pharmacology*, 1 : 135-156.

Jiang P, Shi F-X, Li Y-L, Liu B et Li L-F. 2016. Development of highly transferable microsatellites for *Panax ginseng* (Araliaceae) using whole-genome data. *Applications in plant sciences*, 4 : apps.1600075.

Jin S, Zhang Q, Kang X, Wang J et Zhao W. 2009. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals of Oncology*, 21 : 263-268.

Kang NJ, Shin SH, Lee HJ et Lee KW. 2011. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther*, 130 : 310-324.

Khan N, Monagas M, Andres-Lacueva C, Casas R, Urpí-Sardà M, Lamuela-Raventós RM et Estruch R. 2012. Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22 : 1046-1053.

Kim H, Lee A, Jo J, Moon B, Ji Y et Kim H. 2014. Optimization of ultrasonic- assisted extraction of continentalic acid from the root of *Aralia continentalis* by using the response surface methodology. *Arch Pharm Res*, 37 : 1437-1444.

Kim J-S, Kang S-S et Park J-S. 1998. Antioxidant components from *Aralia continentalis*. Proceedings of the Korean Society of Applied Pharmacology : 182-182.

Kim M, Kim J et Yoon K. 2013a. Effects of blanching on antioxidant activity and total phenolic content according to type of medicinal plants. Food Sci Biotechnol, 22 : 817-823.

Kim MO, Lee SH, Seo JH, Kim IS, Han AR, Moon DO, Cho S, Cui L, Kim J et Lee HS. 2013b. *Aralia cordata* inhibits triacylglycerol biosynthesis in HepG2 cells. J Med Food, 16 : 1108-1114.

Kitts D et Hu C. 2000. Efficacy and safety of ginseng. Public Health Nutr, 3 : 473-485.

Klaus S, Pültz S, Thöne-Reineke C et Wolfram S. 2005. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. International journal of obesity, 29 : 615.

Kohen R et Nyska A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic pathology, 30 : 620-650.

Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B et Joseph JA. 2010. Blueberry supplementation improves memory in older adults. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 : 3996-4000.

Krutmann J et Schroeder P. 2009. Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. J Invest Dermatol Symp Proc, 14 : 44-49.

Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA et Passeron T. 2017. The skin aging exposome. Journal of Dermatological Science, 85 : 152-161.

Kurkin VA et Ryazanova TK. 2018. Quantitative Determination of Total Saponins in *Aralia Mandshurica* Plant Raw Material. Pharmaceutical Chemistry Journal, 52 : 455-458.

Lacey L. 1993. Micmac medicines remedies and recollections. Halifax, N.S. : Nimbus Pub., Halifax, N.S., 125 p.

Lee HB, Kim EK, Park SJ, Bang SG, Kim TG et Chung DW. 2011. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalin synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91 : 2315-2321.

Lee J, Ha Y, Jeong C, Kim Y et Park Y. 2009. Isolation and tandem mass fragmentations of an anti-inflammatory compound from *Aralia elata*. Arch Pharm Res, 32 : 831-840.

Lee KH. 2000. Research and future trends in the pharmaceutical development of medicinal herbs from Chinese medicine. Public Health Nutr, 3 : 515-522.

- Lee KJ, Song KH, Choi W et Kim YS. 2015. A strategy for the separation of diterpenoid isomers from the root of *Aralia continentalis* by countercurrent chromatography: The distribution ratio as a substitute for the partition coefficient and a three- phase solvent system. *Journal of Chromatography A*, 1406 : 224-230.
- Legault J, Dahl W, Debiton E, Pichette A et Madelmont J-C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta medica*, 69 : 402-407.
- Leung KW et Wong AS. 2010. Pharmacology of ginsenosides: A literature review. *Chin Med*, 5 : 20.
- Li HX, O'Neill T, Webster D, Johnson JA et Gray CA. 2012. Anti-mycobacterial diynes from the Canadian medicinal plant *Aralia nudicaulis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 140 : 141-144.
- Li Y, Ren Y, Liu R, Zhang L et Wang M. 2016. Secondary Metabolites from the Root of *Aralia echinocaulis* Hand. -Mazz. *Records of Natural Products*, 10 : 639-644.
- Li Y, Cheng H, Yue R, Duan M et Liu M. 2017a. New neolignan glycoside from the root of *Aralia echinocaulis* Hand. -Mazz. *Natural Product Research*, 31 : 1047-1051.
- Li Y, Park J, Wu Y, Cui J, Jia N, Xi M et Wen A. 2017b. Identification of AMPK activator from twelve pure compounds isolated from : Implication in antihyperglycemic and hypolipidemic activities. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 21 : 279-286.
- Liang T, Zhang X, Xue W, Zhao S, Zhang X et Pei J. 2014. Curcumin induced human gastric cancer BGC-823 cells apoptosis by ROS-mediated ASK1-MKK4-JNK stress signaling pathway. *International journal of molecular sciences*, 15 : 15754-15765.
- Lingpeng Pei. 2010. Improvement of H₂O₂ Induced MC3T3-E1 Osteoblast Damage by *Aralia Echinocaulis* Hand. *Mazz Flavonoids*. Nanjing Shida Xuebao, Ziran Kexueban.
- Lingpeng Pei. 2011. Effect of *Aralia Echinocaulis* Hand. *Mazz Flavonoids* on Osteoporosis Induced by Prednisone in Rats. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 22.
- Lingpeng Pei et Jia Zhu. 2011. Effect of *Aralia Echinocaulis* Hand. *Mazz Flavonoids* on the Differentiation of Osteoclast. *Zhongguo Laonianxue Zazhi*.
- Lu Y-P, Lou Y-R, Yen P, Mitchell D, Huang M-T et Conney AH. 1999. Time Course for Early Adaptive Responses to Ultraviolet B Light in the Epidermis of SKH-1 Mice. *Cancer Research*, 59 : 4591.
- McLoone P, Simics E, Barton A, Norval M et Gibbs NK. 2005. An Action Spectrum for the Production of cis-Urocanic Acid in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 124 : 1071-1074.

Miguel-Chávez R. 2017. Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. Dans :.

Milbury PE, Graf B, Curran-Celentano JM et Blumberg JB. 2007. Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48 : 2343-2349.

Miyase T, Shiokawa KI, Zhang D et Ueno A. 1996. Araliasaponins I- XI, triterpene saponins from the roots of *Aralia decaisneana*. *Phytochemistry*, 41 : 1411-1418.

Moerman DE. 2009. Native American medicinal plants : an ethnobotanical dictionary. Portland, Or. : Timber Press, Portland, Or., 799 p. p.

Moreno-Luna R, Muñoz-Hernandez R, Miranda ML, Costa AF, Jimenez-Jimenez L, Vallejo-Vaz AJ, Muriana FJ, Villar J et Stiefel P. 2012. Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *American journal of hypertension*, 25 : 1299-1304.

Nishigori C. 2015. Current concept of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci*, 14 : 1713-1721.

Nocerino E, Amato M et Izzo AA. 2000. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. *Fitoterapia*, 71 Suppl 1 : S1-5.

Noratto G, Martino HS, Simbo S, Byrne D et Mertens-Talcott SU. 2015. Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26 : 633-641.

O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267 : 5421-5426.

Ou B, Hampsch-Woodill M et Prior RL. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 : 4619-4626.

Panosian A et Wikman G. 2010. Effects of Adaptogens on the Central Nervous System and the Molecular Mechanisms Associated with Their Stress—Protective Activity. *Pharmaceuticals*, 3.

Papandreou MA, Dimakopoulou A, Linardaki ZI, Cordopatis P, Klimis-Zacas D, Margarity M et Lamari FN. 2009. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural brain research*, 198 : 352-358.

Paul A, Bryant C, Lawson MF, Chilvers ER et Plevin R. 1997. Dissociation of lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide synthase and inhibition of DNA synthesis in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 120 : 1439-1444.

Poljsak B, Šuput D et Milisav I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.

Potargowicz E, Szerszenowicz E, Staniszewska M et Nowak D. 2005. [Mitochondria as a source of reactive oxygen species]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 59 : 259-266.

Prabhakar PK et Doble M. 2009. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine*, 16 : 1119-1126.

Prakash V. 2018. Terpenoids as cytotoxic compounds: A perspective. *Pharmacognosy Reviews*, 12 : 166-176.

Prasanth D, Rao AS et Prasad YR. 2017. Pharmacognostic Standardization of *Aralia racemosa* L. Stem. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 : 220-226.

Prior RL et Cao G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27 : 1173-1181.

Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuźmicka L et Tarasiewicz M. 2009. Organism defense against reactive oxygen species. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 62 : 248-256.

Randhir R, Lin YT et Shetty K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13 : 295-307.

Rege NN, Thatte UM et Dahanukar SA. 1999. Adaptogenic properties of six Rasayana herbs used in ayurvedic medicine. *Phytotherapy Research*, 13 : 275-291.

Russian Pharmacopoeia. **2013.** Аралии настойка (Araliae tinctura). https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_4195.htm.

Saito S, Sumita S, Tamura N, Nagamura Y, Nishida K, Ito M et Ishiguro I. 1990. Saponins from the Leaves of *Aralia elata* SEEM. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38 : 411.

Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P et Thiele JJ. 2002. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*, 118 : 618-625.

Schieke SM. 2003. Photoaging and infrared radiation. Novel aspects of molecular mechanisms. *Hautarzt*, 54 : 822-824.

Schieke SM, Schroeder P et Krutmann J. 2003. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19 : 228-234.

Schroeder P, Haendeler J et Krutmann J. 2008. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Experimental gerontology*, 43 : 629-632.

Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S et Krutmann J. 2007. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med*, 43 : 128-135.

Shikov AN, Pozharitskaya ON et Makarov VG. 2016. *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J.Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine*, 23 : 1409-1421.

Singh G. 2010. *Plant Systematics: An Integrated Approach*. CRC Press.

Sun Kim J, Sik Kang S, Sue Choi J, Whan Lee M et Soo Lee T. 1998. Antioxidant components from *Aralia continentalis*. 13-17 p.

Sun YC, Li BM, Lin XT, Xue J, Wang ZB, Zhang HW, Jiang H, Wang QH et Kuang HX. 2017. Simultaneous Determination of Four Triterpenoid Saponins in *Aralia elata* Leaves by HPLC-ELSD Combined with Hierarchical Clustering Analysis. *Phytochemical Analysis*, 28 : 202-209.

Takikawa M, Inoue S, Horio F et Tsuda T. 2010. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *The Journal of nutrition*, 140 : 527-533.

Terauchi M, Horiguchi N, Kajiyama A, Akiyoshi M, Owa Y, Kato K et Kubota T. 2014. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on menopausal symptoms, body composition, and cardiovascular parameters in middle-aged women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Menopause*, 21 : 990-996.

The Plant List. 2013. ARALIACEAE.

Tian S, Nakamura K, Cui T et Kayahara H. 2005. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of chromatography*, 1063 : 121-128.

Tsai H-C, Li Y-C, Hsu S-H, Young T-H et Chen M-H. 2016. Inhibition of growth and migration of oral and cervical cancer cells by citrus polyphenol. *Journal of the Formosan Medical Association*, 115 : 171-185.

Uchiyama S, Taniguchi Y, Saka A, Yoshida A et Yajima H. 2011. Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition*, 27 : 287-292.

V. Miroshnichenko I, A. Yarilin A, K. Aknazarova R et M. Trofimchik S. 1985. Different effects of tonics on the immune response. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 19 : 85-87.

Velderrain-rodriguez GR, Palafox-carlos H, Wall-medrano A, Ayala-zavala JF, Chen CyO, Robles-sanchez M, Astiazaran-garcia H, Alvarez-parrilla E et Gonzalez-aguilar GA. 2014. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct*, 5 : 189-197.

Wang J, Li Q, Ivanochko G et Huang Y. 2006. Anticancer effect of extracts from a North American medicinal plant-- wild sarsaparilla. *Anticancer research*, 26 : 2157.

Wang Q-H, Zhang J, Ma X, Ye X-Y, Yang B-Y, Xia Y-G et Kuang H-X. 2011. A New Triterpenoid Saponin from the Leaves of *Aralia elata*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9 : 17-21.

Wang Z, Wu Q, Meng Y, Sun Y, Wang Q, Yang C, Yang B et Kuang H. 2015. Determination and pharmacokinetic study of two triterpenoid saponins in rat plasma after oral administration of the extract of *Aralia elata* leaves by UHPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 985 : 164-171.

Webster D, Lee TDG, Moore J, Manning T, Kunimoto D, LeBlanc D, Johnson JA et Gray CA. 2010. Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Canadian Journal of Microbiology*, 56 : 487-494.

Wei-yan Ju et Bing-Chao Li. 2012. Isolation and Structural Identification of Flavonoids from *Aralia Continentalis*. Kitagawa. *Shipin Gongye Keji*, 33 : 81-83.

Wen J. 1993. Generic delimitation of *Aralia* (Araliaceae). *Brittonia*, 45 : 47-55.

Wen J, Plunkett GM, Mitchell AD et Wagstaff SJ. 2001. The evolution of Araliaceae : A phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Sistematic Botany* : 144-167.

Weng Y, Zhang L-q, Wei G, Duan J-l, Guan Y, Xi M-m et Wen A-d. 2014a. Quality standard of root bark of *Aralia taibaiensis*. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 25 : 263-264.

Weng Y, Yu L, Cui J, Zhu Y-R, Guo C, Wei G, Duan J-L, Yin Y, Guan Y, Wang Y-H, Yang Z-F, Xi M-M et Wen A-D. 2014b. Antihyperglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of total saponins extracted from *Aralia taibaiensis* in experimental type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 152 : 553-560.

Wojcicki J S, L. Kadlubowska D et Lutomski J. 1977. Studies on the saponin fraction from the root of *aralia mandshurica* part 4 influence of the saponosides on the content of lipids in blood serum and liver in experimental hyper lipemia. *Herba Polonica*, 23 : 285-290.

Wu Y, Zou HD, Cheng H, Zhao C, Sun L, Su S, Li S et Yuan Y. 2012. Cloning and characterization of a beta- amyrin synthase gene from the medicinal tree *Aralia elata* (Araliaceae). *Genet Mol Res*, 11 : 2301-2314.

Xia Yin. 2011. Study on Effect of *Aralia Echinocaulis* Hand. Mazz in Rat Fracture Model. *Guangdong Yuansu Kexue* : 23-27.

Xu J-Y, Wu L-Y, Zheng X-Q, Lu J-L, Wu M-Y et Liang Y-R. 2010. Green Tea Polyphenols Attenuating Ultraviolet B–Induced Damage to Human Retinal Pigment Epithelial Cells *In Vitro*. Investigative ophthalmology & visual science, 51 : 6665-6670.

Yance D et Tabachnik B. 2007. Breakthrough solutions in herbal medicine, adaptogenic formulas: The way to vitality (excerpt). Townsend Letter for Doctors and Patients, 282.

Yang J et Kwak C. 2016. Inhibitory effect of *Aralia elata* ethanol extract against skin damage in UVB-exposed human keratinocytes and human dermal fibroblasts. J Nutr Health, 49 : 429-436.

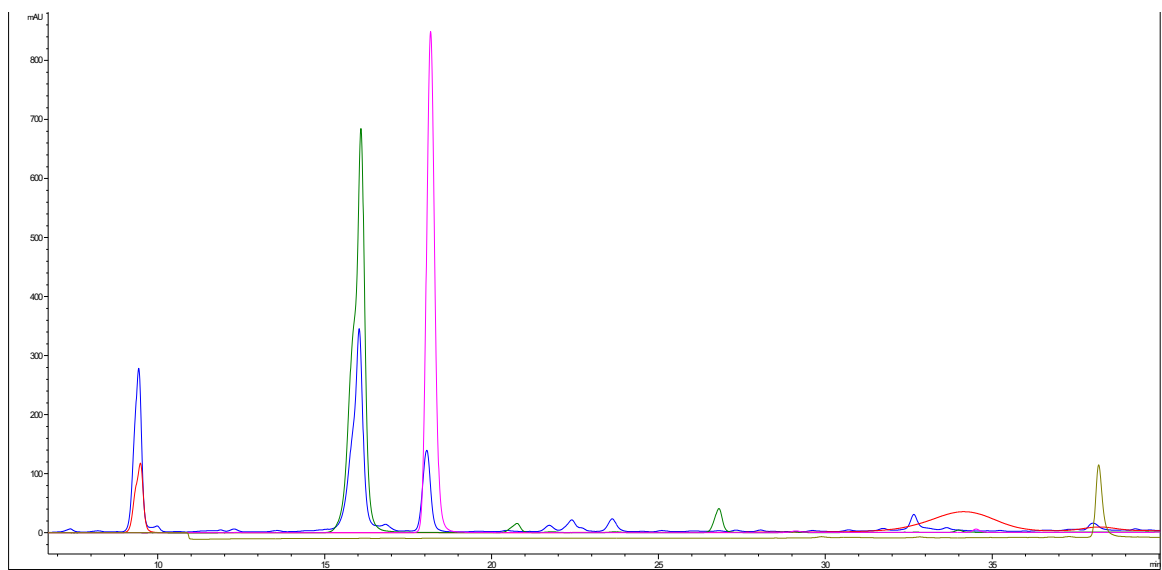
Yin P, Zhao S, Chen S, Liu J, Shi L, Wang X, Liu Y et Ma C. 2011. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of polyphenols from burs of *Castanea mollissima* Blume. Molecules, 16 : 9764-9774.

Yuan JP, Wang JH et Liu X. 2007. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora—implications for health. Molecular nutrition & food research, 51 : 765-781.

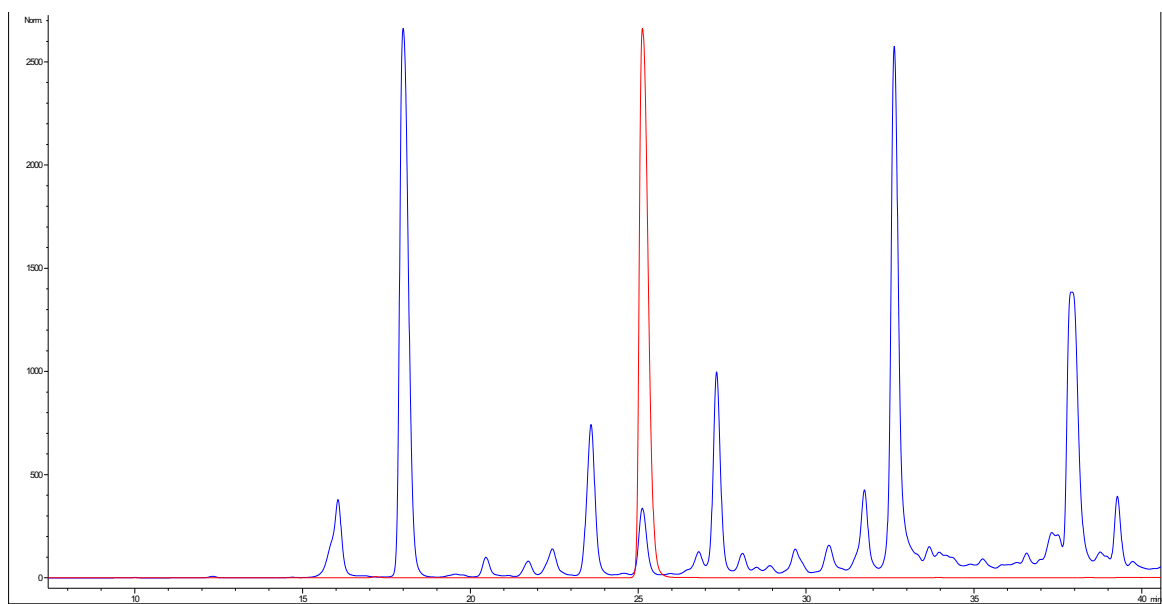
Zhao Q, Huo XC, Sun FD et Dong RQ. 2015. Polyphenol-rich extract of *Salvia chinensis* exhibits anticancer activity in different cancer cell lines, and induces cell cycle arrest at the G0/G1-phase, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells. Molecular medicine reports, 12 : 4843-4850.

ANNEXE I

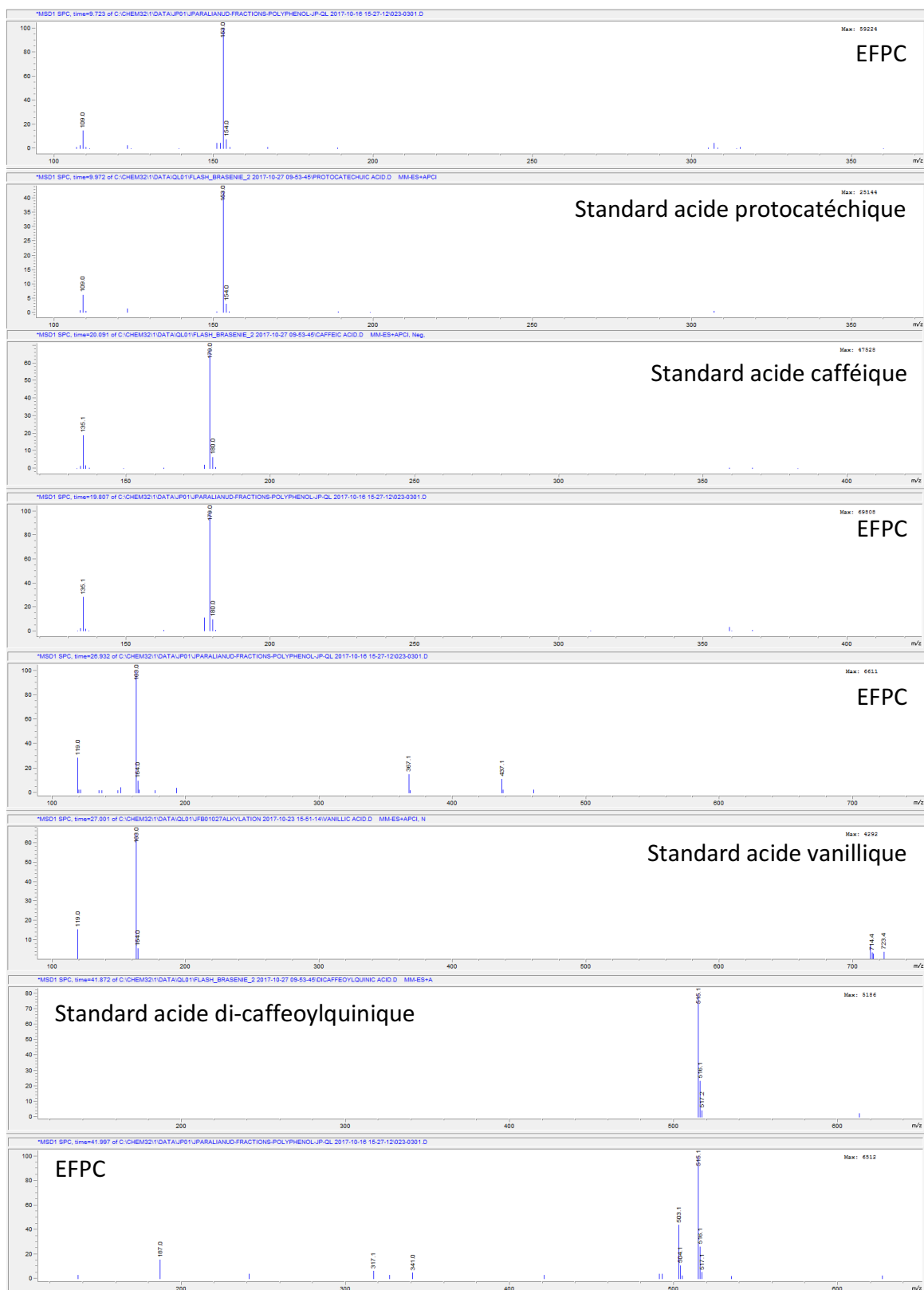
CHROMATOGRAMMES

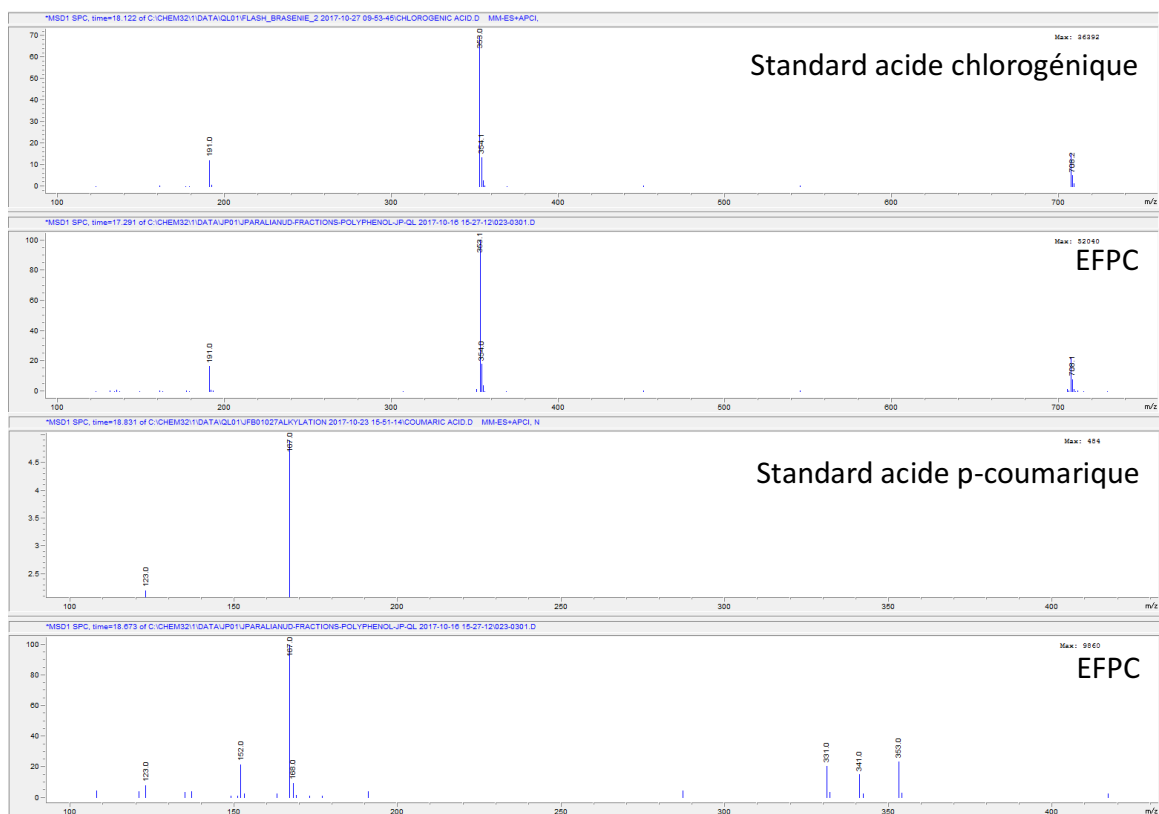


Annexe 1 - Superposition chromatogrammes EFPC (bleu) et standards : PA (rouge), ChA (vert) et CA (rose) - 280 nm



Annexe 2 - Superposition chromatogramme EFPC (bleu) et standard d'acide p-coumarique (rouge) - 350nm

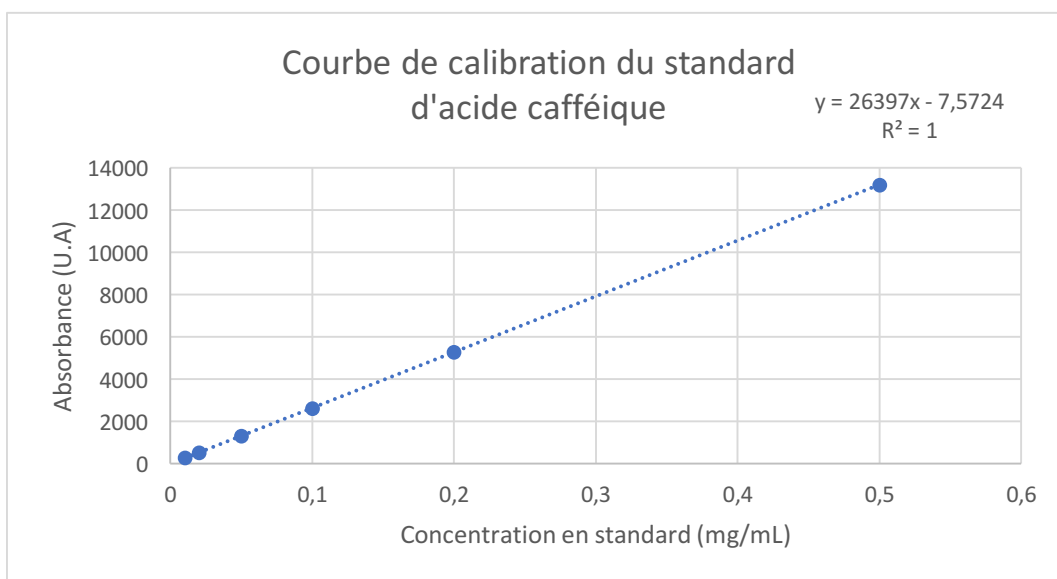
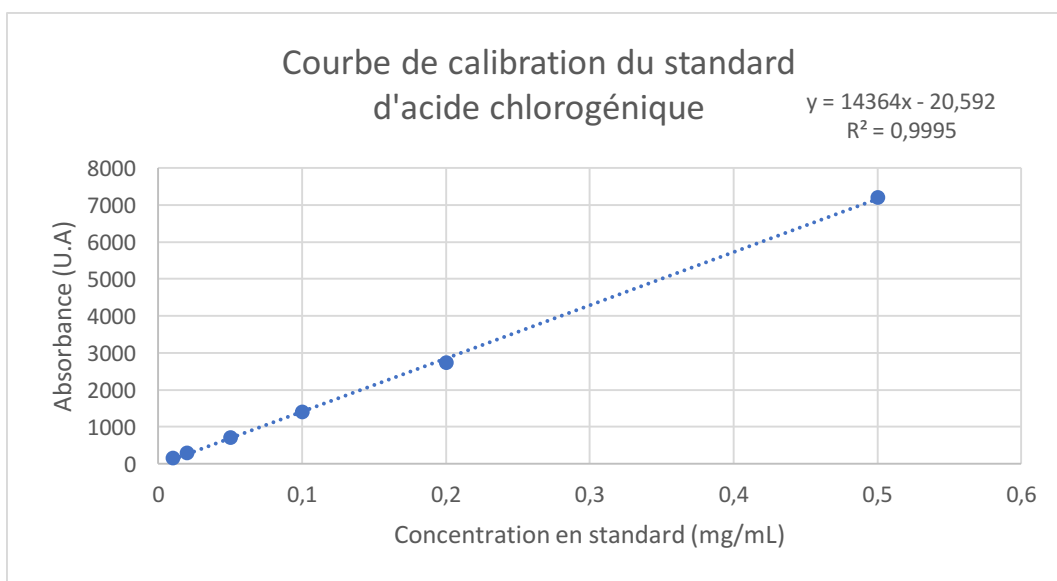
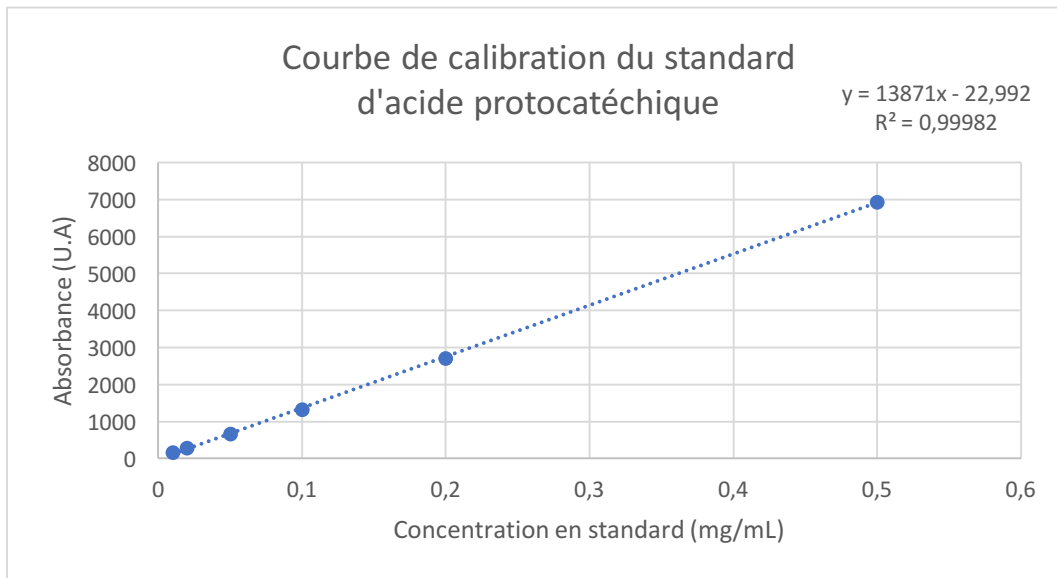




Annexe 3 - Spectres MS des composés phénoliques majoritaires et des standards

ANNEXE II

COURBES DE CALIBRATION HPLC



Annexe 4 - Courbe de calibration par HPLC des standards d'acides phénoliques

ANNEXE III
ACTIVITÉS
BIOLOGIQUES DES
EXTRAITS BRUTS

Échantillons	DCFH-DA (antiox-cellule)	IC ₅₀ Anti-inflam.	% inhibition (anti-inflam.)	ORAC (en µmol Trolox/mL)
Extrait HEXANE	9 ± 2 µg/ml	11.2 ± 0.9 µg/ml	72.5% @ 20 µg/ml	12,78 ± 1,69
Extrait MeOH	145 ± 48 µg/ml	NA	trop toxique!	1,44 ± 0,19
Extrait MeOH:H ₂ O	2,7 ± 0,2 µg/ml	26 ± 2 µg/ml	92.3% @ 80 µg/ml	13,03 ± 2,46
Fraction AcOEt	0,38 ± 0,04 µg/ml	NA	56,1% @ 1,25 µg/ml	91,81 ± 11,52
Fraction BuOH	6,5 ± 0,7 µg/ml	69 ± 2 µg/ml	82.6% @ 160 µg/ml	26,14 ± 2,67
Fraction H ₂ O	22 ± 4 µg/ml	>160 µg/ml	12.8% @ 160 µg/ml	5,36 ± 0,53
Quercetin	0,17 ± 0,02 µg/ml			67,82 ± 53,90

Annexe 5 - Tableau récapitulatif des activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits bruts

